Untersuchungen zur Synthese von Lipiden plastidärer Membranen

Inaugural Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe Universität
zu Frankfurt am Main

von
Udo Kosmac
aus Moers

Frankfurt am Main, 1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523716_0044

Untersuchungen zur Synthese von Lipiden plastidärer Membranen

Inaugural Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe Universität
zu Frankfurt am Main

von
Udo Kosmac
aus Moers

Frankfurt am Main, 1984

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Biologie der Universität Frankfurt am Main

Dekan: Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn
1. Gutachter: Prof. Dr. J. Feierabend
2. Gutachter: Prof. Dr. A. Ried
Tag der Promotion: 19.11. 1984

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Abkürzungen	1
I. EINLEITUNG	2
II. MATERIAL UND METHODEN	24
1. Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen	24
2. Isolierung der Plastiden	25
3. Herstellung zellfreier Extrakte	27
4. Extraktion der Lipide und Pigmente	28
4.1. Glycerolipide	28
4.2. Prenylchinone	29
4.3. Protochlorophyll(id)	30
4.4 Saponine	30
5. Einbau radioaktiver Vorstufen	31
5.1. Einbau von ^{14}C-Acetat in Blattsegmente	31
5.2. Glycerolipidsynthese aus ^{14}C-Acetat in vitro	33
5.3. Galactolipidsynthese aus UDP-^{14}C-Galactose in vitro	33
6. Verseifung der Glycerolipide und Methylierung der Fettsäuren	34
7. Chromatographische Verfahren	35
7.1. Reinigung von Glycolipiden durch Säulenchromatographie	35
7.2. Reinigung von 26-Desgucoavenacosiden durch Säulenchromatographie	36
7.3. Trennung der Glycolipide durch Dünnschichtchromatographie	37
7.4. Auftrennung der Galactolipide nach ihrer Fettsäurezusammensetzung	37
7.5. Dünnschichtchromatographie von Fettsäuremethylestern	38
7.6. Dünnschichtchromatographie der Prenylchinone	39
7.7. Dünnschichtchromatographie der Saponine	39

Seite

8. Nachweismethoden 40
8.1. Allgemeine Nachweise 40
8.2. Nachweis von Glycolipiden 40
8.3. Nachweis von Steroiden und Saponinen 40
8.4. Nachweis von α-Tocopherol und Plastochinon-9 41
8.5. Nachweis von Phyllochinon 41
8.6. Fluorographie von Dünnschichtchromatogrammen 41
9. Quantitative Bestimmungsmethoden 42
9.1. Quantitative Glycolipidbestimmung 42
9.1.1. Densitometrische Messung der Glycolipide 42
9.1.2. Bestimmung der Glycolipide mit Phenol-Schwefelsäure 43
9.2. Quantitative Bestimmung der Saponine 43
9.3. Quantitative Bestimmung der Prenylchinone 44
9.3.1. Quantifizierung von Plastochinon-9 44
9.3.2. Quantitative Bestimmung von α-Tocopherol 44
9.3.3. Quantitative Bestimmung von Phyllochinon 45
9.4. Quantitative Bestimmung von Protochlorophyll(id) 45
9.5. Quantitative Bestimmung des Chlorophylls 46
9.6. Messung der Radioaktivität durch Flüssigkeits-Szintillationsmessung 46
9.7. Bestimmung von Enzymaktivitäten 47
9.7.1. NADP-abhängige Glycerinaldehyd-phosphat Dehydrogenase 47
9.7.2. NAD-abhängige Malat Dehydrogenase 47
III. ERGEBNISSE 48
1. Beschreibung des experimentellen Systems .. 48
2. Analyse der qualitativen und quantitativen Lipidzusammensetzung 49

Seite

2.1. Protochlorophyll(id) 51
2.2. Saponine 51
2.3. Prenylchinone 56
2.4. Glycolipide 59
3. Regulation der Galactolipidakkumulation ... 66
3.1. Vergleich der Synthese von Fettsäuren und Glycerolipiden in Blattsegmenten verschiedenen Entwicklungsalters 67
3.2. Turnover der Fettsäuren von Glycerolipiden 80
3.3. Fettsäure- und Glycerolipidsynthese in isolierten Plastiden 86
3.4. Synthese von Galactolipiden in isolierten Plastiden mit UDP-^{14}C-Galactose als Substrat 98
IV. DISKUSSION 102
V. ZUSAMMENFASSUNG 117
VI. LITERATURNACHWEIS 120

ABKÜRZUNGEN

ACP	-	Acyl-Carrier-Protein
ATP	-	Adenosintriphosphat
CDP	-	Cytidindiphosphat
CTP	-	Cytidintriphosphat
CoA	-	Coenzym A
DEAE-	-	Diethylaminoethyl-
DG	-	Diglycerid(e)
DGDG	-	Digalactosyldiacylglycerid
DNA	-	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	-	Ethylendinitrilotetraessigsäure
kd	-	Kilodalton
Kp	-	Kondensationspunkt
MGDG	-	Monogalactosyldiacylglycerid
NADH	-	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert
NADPH	-	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat, reduziert
RNA	-	Ribonucleinsäure
SQDG	-	Sulfochinovosyldiacylglycerid
Tricin	-	N-Tris(hydroxymethyl)-methyl-glycin
TriGDG	-	Trigalactosyldiacylglycerid
Tris	-	Trishydroxymethylaminomethan
UDP	-	Uridindiphosphat

I. EINLEITUNG

Eukaryotische Zellen enthalten im Gegensatz zu prokaryotischen Zellen eine Vielzahl von Kompartimenten. Die Abgrenzung der Zellen von der Umgebung und der Kompartimente gegeneinander wird durch Membranen ermöglicht. Die licht- und elektronenoptisch sichtbare Gliederung der Zelle stellt damit ein Abbild der Aufgabenteilung innerhalb der Zelle dar.

Eine Sonderstellung bei dieser Kompartimentierung haben neben den Mitochondrien die Plastiden: beide Organellen sind von einer Doppelmembran umgeben, während alle anderen Organellen nur von einer einfachen Membran umhüllt sind. Weiterhin besitzen Chloroplasten und Mitochondrien als einzige Organellen eigene genetische Information prokaryotischen Charakters, eigene Transkriptions- und Translationssysteme, die prokaryotische Eigenschaften aufweisen.

Die Plastiden, die auffälligsten pflanzlichen Organellen, sind durch Membranen selbst weiter gegliedert. Als Beispiel seien die Zustände bei ausdifferenzierten Chloroplasten und Etioplasten aufgeführt: Chloroplasten enthalten innerhalb ihrer doppelten Hüllmembran ein großflächiges Membransystem, die Thylakoide, das weiter in Stroma- und Granathylakoide unterteilt ist. Die Thylakoide sind die eigentlichen Träger der photosynthetischen Aktivität. Wesentliche Bausteine der Thylakoidmembranen sind die Chlorophyll-Protein-Komplexe. Die photosynthetische Elektronentransportkette befindet sich ebenfalls in den Thylakoidmembranen. Etioplasten besitzen wie alle anderen Differenzierungstypen der Plastiden eine doppelte Hüllmembran. Membransysteme im Inneren der Etioplasten sind zu einem oder mehreren sogenannten Prolamellarkörpern differenziert, die je nach Pflanzenart mehr oder weniger stark

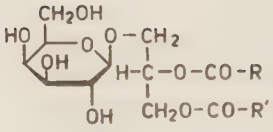
parakristallin aufgebaut sind. Von den Rändern des Prolamellarkörpers gehen sogenannte Prothylakoide aus, denen die wesentlichen Bestandteile der Thylakoidmembranen von Chloroplasten, die Chlorophyll-Protein-Komplexe, noch fehlen.
Bei Belichtung zerfällt der Prolamellarkörper in sehr kurzer Zeit. Sein Material wird allem Anschein nach zur raschen Bildung der Thylakoide benutzt. Die bereits vorhandenen Prothylakoide differenzieren sich ebenfalls zu voll funktionsfähigen Thylakoiden.
Ältere Chloroplasten und Etioplasten enthalten osmiophile Plastoglobuli, die als Lipidspeicher angesehen werden (Lichtenthaler und Weinert, 1970)

Bereits Menke und Jakob (1942) zeigten, daß photosynthetische Membranen zu einem großen Teil aus Lipiden bestehen. Dem Begriff Lipide ist hier wie im Weiteren die Bedeutung des englischen 'lipids' zugrunde gelegt; eine Unterteilung in die Lipide im engeren Sinne und Lipoide wird nicht getroffen.

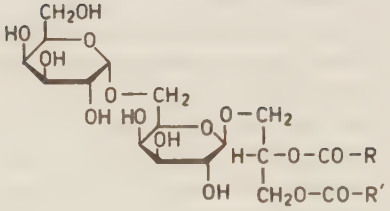
Als lipophile Bestandteile der photosynthetischen Membranen wurden Pigmente (Chlorophylle und Carotinoide), Glycerolipide (Phospholipide und Glycolipide) und Prenylchinone beschrieben (Lichtenthaler und Park, 1963). Glycerolipide stellen die Hauptkomponenten der Membranlipide.
Die Glycerolipide (Abb. 1) setzen sich aus folgenden Grundelementen zusammen: An einem Glyceringrundgerüst sind zwei Fettsäuren an C_1 und C_2 verestert. Die OH-Gruppe des C_3-Atoms wird zur Bindung der verschiedenen polaren Gruppen benutzt.

Die Fettsäurezusammensetzung plastidärer Membranen zeichnet sich durch einen hohen Grad an dreifach ungesättigten Fettsäuren aus. Es lassen sich zwei Pflanzengruppen unterscheiden: solche, die Hexadeca-

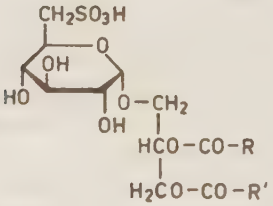
A.



Monogalactosyl-
diacylglycerid

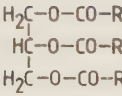


Digalactosyl-
diacylglycerid

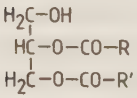


Sulfochinovosyl-
diacylglycerid

B.

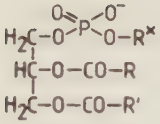


Triglyceride



Diglyceride

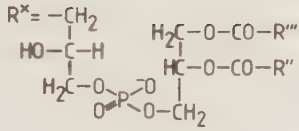
C.



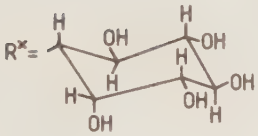
Grundgerüst

R^x=H

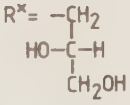
Phosphatidsäure



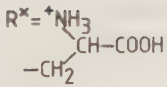
Diphosphatidylglycerin



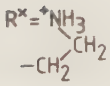
Phosphatidylinosit



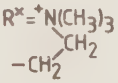
Phosphatidylglycerin



Phosphatidylserin



Phosphatidyl-
ethanolamin



Phosphatidylcholin

Abb. 1: Glycerolipide pflanzlicher Membranen.
A. - Glycolipide, B. - neutrale Glycerolipide,
C. - Phospholipide

R, R', R" und R" - Kohlenwasserstoffe verschiedener Kettenlänge und Desaturierung

triensäure besitzen, wie z.B. Brassicaceen, Chenopodiaceen, Apiaceen und Solanaceen, und solche, denen diese Fettsäure fehlt, wie z.B. Leguminosen, Asteraceen und Getreide (Jamieson und Reid, 1971; Mudd und Garcia, 1975). In der neueren Literatur werden die Pflanzen, die Hexadecatriensäure enthalten, als $C_{16:3}$-Pflanzen, solche, die nur Linolensäure besitzen, als $C_{18:3}$-Pflanzen bezeichnet (Heinz und Roughan, 1983).
Die Hexadecatriensäure ist, wenn vorhanden, ausschließlich an die C_2-Position des Glyceringrundgerüsts gebunden. In den sogenannten $C_{18:3}$-Pflanzen ist die Hexadecatriensäure durch Linolensäure oder durch Palmitinsäure ersetzt.
Die bei weitem häufigste Fettsäure der plastidären Membranen ist die Linolensäure, die in $C_{18:3}$-Pflanzen über 90 % der Fettsäurereste der Galactolipide stellen kann und in $C_{16:3}$-Pflanzen über die Hälfte der Fettsäuren der plastidären Lipide darstellt (Jamieson und Reid, 1971; Douce und Joyard, 1980; Mudd und Garcia, 1975). Im Monogalactosyldiacylglycerid ist nahezu ausschließlich (zu über 90 %) Linolensäure an C-Atom 1 und 2 des Glyceringrundgerüstes verestert (Roughan und Slack, 1982).

Eine weitere besondere Fettsäure weisen die Plastiden im Phosphatidylglycerin auf. Die am C_2 des Glycerins gebundene C_{16}-Fettsäure ist einfach ungesättigt und weist trans-Konfiguration auf (Haverkate und van Deenan, 1965).

Benson et al. (1958, 1959) und Wintermans (1960, 1962) zeigten, daß Galactolipide, deren chemische Struktur von Carter et al. (1956) aufgeklärt worden war (Abb. 1 A), den größten Anteil am Lipidmaterial der photosynthetischen Membranen ausmachten. Das häufigste Phospholipid war Phosphatidylglycerin. Wintermans (1960, 1962) gibt folgende Lipidzusammensetzung der Membranen von

Chloroplasten an: 53 % Monogalactosyldiacylglycerid, 24 % Digalactosyldiacylglycerid, 7 % Sulfochinovosyldiacylglycerid, 8 % Phosphatidylglycerin, 6 % Phosphatidylcholin und 1 % Phosphatidylethanolamin. Diese Analyse hat auch heute noch weitgehende Gültigkeit. Das Fehlen von Phosphatidylethanolamin in den Lipidextrakten von Plastiden wird von Douce und Joyard (1980) als Kennzeichen für die Reinheit der Plastiden angesehen, d.h. Phosphatidylethanolamin ist nicht in den Membranen der Plastiden vertreten, obwohl es in den anderen Zellmembranen eine Hauptkomponente darstellt. Auf der anderen Seite sind die drei Glycolipide (Monogalactosyl-, Digalactosyl-und Sulfochinovosyldiacylglycerid) mit großer Wahrscheinlichkeit in ihrer Lokalisation auf die Hüllmembranen, die inneren Plastidenmembranen und die Plastoglobuli beschränkt. Nachweise der Galactolipide in Microsomenfraktionen und Mitochondrienpräparationen werden von Douce und Joyard (1980) mit Kontaminationen durch Hüllmembranen der Plastiden erklärt. Einen eindeutigen Nachweis, daß Mitochondrienmembranen keine Galactolipide besitzen, erbrachten Fuchs et al. (1981), indem sie Mitochondrien aus Protoplasten isolierten.

Die verschiedenen Membranen der Plastiden zeigen eine große Einheitlichkeit in ihrer qualitativen Glycerolipidzusammensetzung, die von der Zusammensetzung der anderen Zellmembranen charakteristisch verschieden ist. Während in allen extraplastidären Membranen die stickstoffhaltigen Phospholipide den größten Teil der Lipidfraktion stellen, spielen sie in den Plastiden eine untergeordnete Rolle (Tabelle 1). Quantitative Analysen zeigen deutliche individuelle Unterschiede der Glycerolipidzusammensetzung der plastidären Membranen (Tabelle 1). Die Zusammensetzung der Glycerolipidfraktion ist in den Hüllmembranen verschiedener Differen-

Material	(Lit.)	MGDG	DGDG	SQDG	PG	PC	PE	PI	PS	DPG
Glyoxysomen	(1)	-	-	-	-	49	31	6	-	2
Peroxisomen	(2)	-	-	-	15	61	20	4	-	-
Kern(hülle)	(3)	-	-	-	6	27	20	8	3	1
Plasmalemma	(2)	-	-	-	-	66	21	13	-	-
cytoplasmatische Membranen	(2)	-	-	-	-	38	47	15	-	-
Mitochondrien										
ganz	(2)	-	-	-	3	43	32	11	1	7
innere Membran	(2)	-	-	-	3	41	37	5	-	20
	(4)	-	-	-	1	29	50	2	-	17
äußere Membran	(2)	-	-	-	10	42	24	21	-	3
	(4)	-	-	-	2	68	24	5	-	0
Chloroplasten										
Hüllmembran	(5)	22	32	5	8	27	1	Tr.	-	-
	(6)	22	44	10	9	14	-	-	-	-
Thylakoide	(5)	51	26	7	9	3	0	1	0	0
Stromathylakoide	(6)	42	37	9	10	2	-	-	-	-
Granathylakoide	(6)	47	36	7	9	1	-	-	-	-
Etioplasten	(6)	36	41	10	9	4	-	-	-	-
	(7)	50	32	9	5	5	-	-	-	-

Tabelle 1: Glycerolipidzusammensetzung pflanzlicher Membranen.

Angaben in % der polaren Lipide

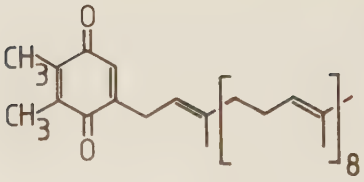
1 - Donaldson et al., 1972; 2 - Mazliak, 1977; 3 - Philipp et al., 1976; 4 - Bligny und Douce, 1980; 5 - Douce et al., 1973; 6 - Bahl et al., 1976; 7 - Ryberg et al., 1983)

Abkürzungen: PG - Phosphatidylglycerin, PC - Phosphatidylcholin, PE - Phosphatidylethanolamin, PI - Phosphatidylinosit, PS - Phosphatidylserin, DPG - Diphosphatidylglycerin, Lit. - Literatur, Tr. - Spuren

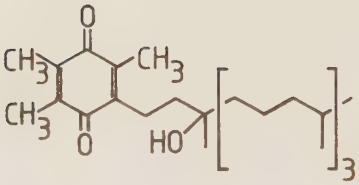
zierungstypen der Plastiden gleich (Douce und Joyard, 1979) und unterscheidet sich von der Zusammensetzung der inneren Membranen der Plastiden durch einen geringeren Anteil Monogalactosyldiacylglycerid und erhöhte Anteile Digalactosyldiacylglycerid und Phosphatidylcholin (Tabelle 1). Das Verhältnis von Monogalac-

tosyldiacylglycerid zu Digalactosyldiacylglycerid in den Hüllmembranen der Plastiden liegt zwischen 0,3 und 0,8, während das Verhältnis dieser Lipide in den Thylakoidmembranen etwa 2 ist (Douce und Joyard, 1979).

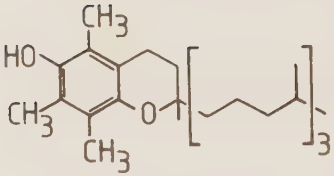
Außer den Glycerolipiden enthalten die plastidären Membranen und die Plastoglobuli chloroplastenspezifische Prenylchinone, die aus einem chinoiden Ring und einer isoprenoiden Seitenkette verschiedener Länge bestehen (Abb. 2) (Lichtenthaler et al., 1981). Ausschließlich in den Plastiden lokalisiert sind die Benzochinone Plastochinon-9 und α-Tocochinon und das Naphthochinon Phyllochinon (Vitamin K_1). Mit ihren Hydrochinonen stellen diese Prenylchinone Redoxsysteme dar. Das Hydrochinon des α-Tocochinons lagert sich unter Wasserabgabe sehr leicht in sein Chromanol, das α-Tocopherol (Vitamin E), um. Eine eindeutige Funktion kann bisher nur dem Plastochinon-9 in den Thylakoidmembranen zugeordnet werden, wo es in der photosynthetischen Elektronentransportkette ein funktionelles Glied darstellt (Trebst, 1978). Für das Phyllochinon liegen Hinweise vor, daß es ebenfalls am photosynthetischen Elektronentransport beteiligt ist (Lichtenthaler und Pfister, 1978 b; Lichtenthaler, 1980). Eine Wirkung als Antioxidans wird vor allem dem α-Tocopherol zugeschrieben (Lichtenthaler und Tevini, 1969).
Wie bei den Glycolipiden zeigte sich auch bei den Prenylchinonen, daß die quantitative Zusammensetzung der inneren Membranen von der der Hüllmembranen deutlich verschieden war. Lichtenthaler et al. (1981) wiesen nach, daß in den Hüllmembranen der Anteil des α-Tocopherols deutlich höher war als in den Thylakoiden, während Plastochinon-9 und Phyllochinon einen geringeren Anteil (etwa 1/3 der Menge, die in Thylakoiden nachweisbar war) stellten.



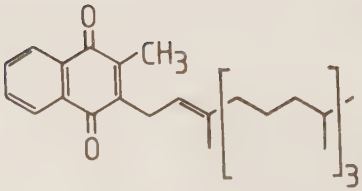
Plastochinon-9



α-Tocochinon



α-Tecopherol



Phyllochinon (Vitamin K_1)

Abb. 2: Plastidäre Prenylchinone.

Neben den Glycerolipiden und den Prenylchinonen enthalten die Hüllmembranen und die inneren Membranen der Plastiden Carotinoide (Douce et al., 1973; Lichtenthaler et al., 1981). Chlorophylle sind dagegen auf die Thylakoide in ihrem Vorkommen beschränkt (Douce und Joyard, 1979) und sind die vorherrschenden Pigmente der Chloroplasten. In Etioplasten sind Carotinoide die mengenmäßig bedeutendste Pigmentgruppe. Chlorophylle sind in den inneren Membranen und den Prolamellarkörpern dieser Organellen nur durch ihre Vorstufe, das Protochlorophyll(id), vertreten. Protochlorophyll(id) wird erst bei Belichtung des Pflanzenmaterials durch eine NADP-abhängige Protochlorophyll(id) Oxido-Reductase in Chlorophyll(id) umgewandelt. Über die Verteilung sowohl des Protochlorophyll(id)s als auch der Protochlorophyll(id) Oxido-Reductase liegen in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse vor. Lütz und Klein (1979) trennten Prothylakoide und Prolamellarkörper des Hafers voneinander und analysierten deren Zusammensetzung. Sie fanden Protochlorophyll(id) und die Protochlorophyll(id) Oxido-Reductase vor allem, wenn nicht ausschließlich, in den Prothylakoiden. Der Prolamellarkörper enthielt Protochlorophyll(id) und Protochlorophyll(id) Oxido-Reductase nicht oder nur in Spuren (Lütz und Klein, 1979; Lütz, 1978). Entgegengesetzte Ergebnisse erhielten Ryberg und Sundqvist (1982) bei Untersuchungen an Weizenetioplasten; Protochlorophyll(id) war zu 60 % in der Prothylakoidfraktion und zu 40 % in den Prolamellarkörpern vorhanden. In Prothylakoiden und Prolamellarkörpern war das Protochlorophyll(id) zum größten Teil photokonvertierbar, was auf die Anwesenheit der Protochlorophyll(id) Oxido-Reductase sowohl in den Prothylakoiden als auch in den Prolamellarkörpern hinweist.

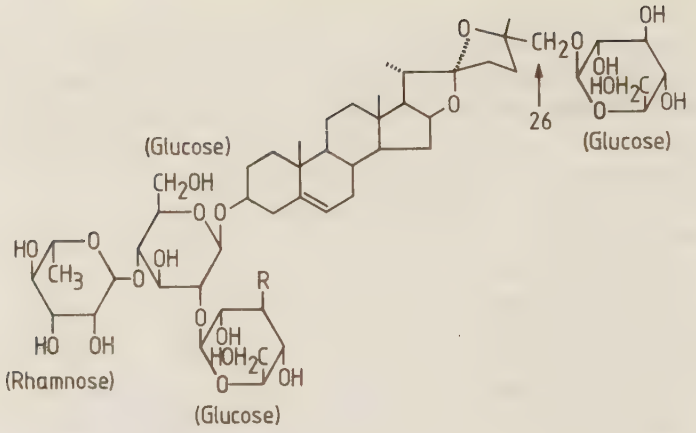


Abb. 3: Molekülstruktur der Saponine.

Avenacosid A: R = H; 26-Desglucoavenacosid A: R = H, Glucose an C-Atom 26 abgespalten; Avenacosid B: R = Glucose; 26-Desglucoavenacosid B: R = Glucose, Glucose an C-Atom 26 abgespalten

Über die molekularen Grundlagen der parakristallinen Struktur der Prolamellarkörper war zu dem Zeitpunkt, als die Untersuchung zu der vorliegenden Arbeit aufgenommen wurden, wenig bekannt. Prolamellarkörper zeigen keine osmotischen Eigenschaften, wie sie sonst für Pflanzenmembranen typisch sind (Lütz, 1978). Kesselmeier und Ruppel (1979) und Kesselmeier und Budzikiewicz (1979) isolierten aus gereinigten Prolamellarkörpern des Hafers zwei Saponine (Abb. 3), die bei Reaggregationsversuchen in vitro sich zu einem netzartigen, dreidimensionalen Gebilde zusammenlagerten, das der Prolamellarkörperstruktur sehr ähnlich sah. Die beiden Saponine wurden zunächst als Avenacosid A und B beschrieben (Abb. 3) (Kesselmeier und Budzikiewicz, 1979), später von Kesselmeier (1982) als deren

Desglucoderivate (Abb. 3) identifiziert. Während die Saponine in den Etioplasten des Hafers in großer Menge vorhanden waren, konnten sie von Kesselmeier und Ruppel (1979) nicht in Chloroplasten nachgewiesen werden. Die Belichtung etiolierter Blätter führte zu einer raschen Abnahme der Saponine in isolierten Plastiden, die offenbar mit dem Zerfall des Prolamellarkörpers und dem gleichzeitigen Aufbau funktionsfähiger Thylakoide einherging. Dies und die Tatsache, daß Saponine auch in den Etioplasten von Gerste und Erbsen gefunden wurden, veranlaßte die Autoren zum damaligen Zeitpunkt zu dem Schluß, in den Saponinen die strukturbestimmenden Lipide der Prolamellarkörper zu sehen. Kosmac (1980) konnte in etiolierten Roggenblättern dagegen keine Saponine auffinden, obwohl diese in ihren Plastiden Prolamellarkörper besitzen, so daß Zweifel angebracht erschienen, ob Saponine generell als Bauelemente der Prolamellarkörper im Pflanzenbereich verwendet werden.

Die Synthese der verschiedenen plastidären Lipide erfolgt zu einem großen Teil innerhalb der Organellen, eine Beteiligung des Cytoplasmas ist aber in vielen Fällen notwendig.

Die Synthese des Porphyringerüstes der Chlorophylle findet vollständig innerhalb der Plastiden statt. δ-Aminolävulinsäure Dehydratase Aktivität und die Bildung von Protochlorophyll(id) sind in isolierten Plastiden nachgewiesen worden (Gough und Kannangara, 1976; Weinstein und Castelfranco, 1977a, 1977b). Der Phytolrest der Chlorophylle wird wie die isoprenoiden Seitenketten der Prenylchinone und die Carotinoide ebenfalls innerhalb der Organellen synthetisiert (Block und Douce, 1980).
Der aromatische Ring der Chinone wird über den Shikimisäureweg, der in den Plastiden lokalisiert ist, in Form von Homogentisinsäure bereitgestellt (Bickel et al.,

1978; Löffelhardt und Kindl, 1979). Zur Synthese von α-Tocopherol wird Homogentisinsäure mit Phytylpyrophosphat zu 2-Methyl-6-Phytylpyrophosphat verbunden, aus dem durch weitere Methylierung mittels S-Adenosinmethionin α-Tocopherol gebildet wird (Soll et al., 1980a, 1980b). Bei der Bildung des Plastochinons wird anstelle des Phytylpyrophosphates Solanesylpyrophosphat an den chinoiden Rest gebunden. Die Phytylierung der Homogentisinsäure und die Methylierungen zu α-Tocopherol und die Phytylierung und Methylierung des Naphthochinongrundgerüstets zu 2-Phythyl-1,4-Naphthochinol finden ausschließlich an der Plastidenhüllmembran statt; die Biosynthese des Plastochinon-9 wird sowohl an der Hüllmembran als auch in den Thylakoidmembranen durchgeführt (Soll et al., 1980a, 1980b; Schultz et al. 1981).

Über die Lokalisierung einer Fettsäuresynthetase im Plastidenstroma bestehen keine Zweifel. Im Laufe des letzten Jahrzehnts mehrten sich die Hinweise, daß die Plastiden der einzige Ort der Pflanzenzelle sind, an dem Fettsäuresynthese stattfindet (Nothelfer et al., 1977; Vick und Beevers, 1978; Ohlrogge et al., 1979). Im Gegensatz zu tierischen Systemen besteht eine zunehmende Unsicherheit darüber, ob in Pflanzen Fettsäuresynthese auch am endoplasmatischen Reticulum stattfindet.
Acetat ist als Ausgangssubstrat der Fettsäuresynthese identifiziert. Seine Bereitstellung innerhalb der Plastiden im Verlauf der Photosynthese ist noch nicht eindeutig geklärt. Einige Autoren berichten, daß die Plastiden durch den Besitz eines Pyruvat Dehydrogenase-Komplexes in der Lage sind, selbst Acetylreste aus Pyruvat zu synthetisieren (Elias und Givan, 1979; Williams und Randall, 1979; Miernyk und Dennis, 1982). Dagegen zeigten Liedvogel und Stumpf (1982), daß

Acetat, das in den Mitochondrien gebildet worden war, in den Plastiden bei der Fettsäurebiosynthese genutzt wurde.

Erstes Produkt der Fettsäuresynthese ist ACP-Palmitinsäure, die weiter zu ACP-Stearinsäure verlängert werden kann. Diese wird noch im Plastidenstroma zu Ölsäure desaturiert (Jacobson et al., 1974), so daß Palmitinsäure und Ölsäure die ersten greifbaren Fettsäuren einer in vitro Synthese mit isolierten Chloroplasten sind. Beide Fettsäuren können aus ihren ACP-Thioestern durch zwei verschiedene Acyltransferasen mit dem C_1 bzw. C_2-Atom des Glycerin-3-Phosphats verestert werden. Zuerst wird die OH-Gruppe des C_1-Atoms verestert. Die Acyltransferase, die diese Bindung zwischen Glycerin-3-Phosphat und Fettsäure vermittelt, ist ein lösliches Enzym des Plastidenstromas und bevorzugt Oleoyl-ACP als Co-Substrat so stark, daß auch bei Palmitoyl-ACP Überschuß zu etwa 90% Ölsäure mit dem C_1-Atom des Glyceringrundgerüstes verestert wird (Frentzen et al., 1982). Die Monoacylglycerin-3-Phosphat Acyltransferase, die die Veresterung der Fettsäure an C-Atom 2 vermittelt, ist an die Plastidenhüllmembran gebunden; sie zeigt eine hohe Spezifität für Palmitoyl-ACP, so daß durch das Zusammenwirken beider Acyltransferasen nur Phosphatidsäure gebildet wird, die Ölsäure an C_1 und Palmitinsäure an C_2 des Glyceringrundgerüstes enthält (Frentzen et al., 1982). Eine Phosphatase, die in der Plastidenhüllmembran lokalisiert ist, setzt aus der Phosphatidsäure Diglyceride frei (Joyard und Douce, 1979), die zur Bildung der Glycerolipide genutzt werden. Ein Fettsäuremuster mit C_{16}-Fettsäuren ausschließlich an C_2-Position wird auch in den Membranen von Blaualgen gefunden (Sato et al., 1979; Zepke et al., 1978; Sato und Murata, 1982). Der beschriebene Syntheseweg der Diglyceride wird daher als prokaryotisch angesehen, und Glycerolipide, bei denen C_{18}-Fettsäuren

von der C_2-Position ausgeschlossen sind als prokaryotisch substituiert definiert (Heinz und Roughan, 1983). In den cytoplasmatischen Membranen höherer Pflanzen weisen die Glycerolipide eine völlig andere Positionsspezifität der Fettsäuren auf: C_{16}-Fettsäuren sind hier von der C_2-Position ausgeschlossen (Sieberts et al., 1979). Eine solche Fettsäuresubstitution wird eukaryotisch genannt. Die Fettsäuresubstitution des Phosphatidylglycerins und des Sulfochinovosyldiacylglycerids der Plastiden ist vollständig prokaryotisch (Bertrams und Heinz, 1981); die Substitution der beiden Galactolipide kann dagegen sowohl pro- als auch eukaryotisch sein. Das Auftreten von Galactolipiden mit prokaryotischer Fettsäurezusammensetzung ist mit dem Auftreten von Hexadecatriensäure in den Galactolipiden der Plastiden gekoppelt, also auf die sogenannten $C_{16:3}$-Pflanzen beschränkt. In ihnen treten beide Substitutionsmuster nebeneinander auf. In den $C_{18:3}$-Pflanzen finden sich dagegen ausschließlich eukaryotisch substituierte Galactolipide (Roughan und Slack, 1982; Heinz und Roughan, 1983). Die Synthese der eukaryotisch substituierten Glycerolipide der Pflanzenzelle (hierzu gehören neben einem Teil der Galactolipide vor allem die stickstoffhaltigen Phospholipide) beschreitet einen anderen Weg, als er für die prokaryotischen Glycerolipide beschrieben wurde: Die Fettsäuren werden aus den Plastiden ins Cytoplasma exportiert. Dies wird durch zwei Enzyme der Plastidenhüllmembran ermöglicht, eine Acyl-ACP Hydrolase auf der Stromaseite und eine Acyl-CoA Synthetase auf der cytoplasmatischen Seite (Roughan und Slack, 1982; Drapier et al., 1982; Dubacq et al., 1983). Die so gebildeten Acyl-CoA-Ester werden am endoplasmatischen Reticulum durch zwei Acyltransferasen an die beiden Bindungsstellen des Glycerin-3-Phosphates verestert. Beide OH-Gruppen werden bevorzugt mit Ölsäure besetzt, C_{16}-Fettsäuren werden von der C_2-Position ausgeschlossen (Sieberts et al., 1979; Heinz und Roughan, 1983).

Die Ölsäure, die in den Plastiden gebildet wird, kann in den Organellen der $C_{18:3}$-Pflanzen nicht weiter desaturiert werden, obwohl der größte Teil der Fettsäurereste der Galactolipide von Linolensäure gestellt wird. Nur in Form des cytoplasmatisch gebildeten Phosphatidylcholins ist offenbar eine Desaturierung der Ölsäure zu Linolsäure möglich, wie durch Doppelmarkierungsversuche mit nachfolgendem Chase von Slack et al. (1977) gezeigt werden konnte. Die weitere Desaturierung der Linolsäure zur Linolensäure findet nach der Übertragung der Diglyceride aus dem Phosphatidylcholin in Monogalactosyldiacylglycerid in der Plastidenhüllmembran statt (Roughan und Slack, 1982). Der dazu notwendige Transport des Phosphatidylcholins könnte durch Phospholipidtransferproteine bewerkstelligt werden (Kader et al., 1982). Es werden nur solche Diglyceride zur Synthese von Monogalactosyldiacylglycerid benutzt, die an beiden Fettsäurebindungsstellen Linolsäure tragen (Slack und Roughan, 1975; Slack et al., 1977).

Bei $C_{16:3}$-Pflanzen besteht dagegen die Möglichkeit, im prokaryotisch substituierten Monogalactosyldiacylglycerid eine Desaturierung von Palmitin- und Ölsäure zu Hexadecatriensäure bzw. Linolensäure durchzuführen (Roughan und Slack, 1982; Drapier et al., 1982; Dubacq et al., 1983). In den $C_{16:3}$-Pflanzen werden beide Synthesewege für die Bildung von Monogalactosyldiacylglycerid genutzt; der eukaryotische Weg trägt den größeren Anteil der Monogalactosyldiacylglyceridsynthese.

Die Galactosylierungsreaktionen finden an der Hüllmembran der Plastiden statt (Joyard und Douce, 1976) und benötigen neben den Diglyceriden UDP-Galactose als Substrat. Dieses wird vom Cytoplasma bereitgestellt (Ferrari und Benson, 1961). Die Bildung von Digalactosyldiacylglycerid wird durch mindestens zwei unabhängige Enzyme erreicht: Diglycerid und Galactose werden

durch eine UDP-Galactose:Diacylglycerid Galactosyltransferase zu Monogalactosyldiacylglycerid verbunden (Joyard und Douce, 1976b). Eine weitere Galactose kann entweder durch eine UDP-Galactose:Monogalactosyldiacylglycerid Galactosyltransferase (Ongun und Mudd, 1968; Heinz, 1977) oder durch eine Monogalactosyldiacylglycerid:Monogalactosyldiacylglycerid Galactosyltransferase (van Besouw und Wintermans, 1979) übertragen werden. Heemskerk et al. (1983) zeigten, daß die Übertragung der Galactose aus einem Monogalactosyldiacylglycerid auf ein zweites Monogalactosyldiacylglycerid wahrscheinlich ausschließlich für die Bildung von Digalactosyldiacylglycerid verantwortlich ist.

Nach dem heutigen Kenntnisstand läuft eine große Zahl von Teilschritten der Lipidsynthese innerhalb der Plastiden bzw. an ihren Membranen ab. Über die Frage, ob die verantwortlichen Enzyme innerhalb der Chloroplasten synthetisiert werden oder ob sie aus dem Cytoplasma importiert werden, liegen bisher nur wenige Informationen vor.

Durch den Besitz eigener genetischer Information, eines eigenen Transkriptionsapparates und einer eigenen Proteinsynthesemaschinerie sind die Plastiden durchaus in der Lage, einen Teil ihrer Nucleinsäuren und Proteine selbst zu synthetisieren. Zum Teil sind sie aber auch auf eine koordinierte Zusammenarbeit mit dem Cytoplasma angewiesen, denn die in der DNA niedergelegte Information reicht bei weitem nicht für alle Polypeptide, die t-RNAs und die m-RNAs dieser Organellen aus. Ein großer Teil der Polypeptide, die in den Plastiden oder deren Membranen lokalisiert sind, wird im Kern kodiert und an cytoplasmatischen 80S Ribosomen translatiert. Für die plastidäre DNA ist bisher die Kodierung folgender Informationen nachgewiesen worden (Herrmann und Possingham, 1980; Herrmann et al. 1983):

- r-RNA für prokaryotische 70S Ribosomen
- t-RNA für alle Aminosäurekodons
- m-RNA (nicht polyadenyliert), die an 70S Ribosomen translatiert wird für:
  - große Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase-Oxigenase
  - α-, β-, ϵ-Untereinheiten des Kopplungsfaktors CF_1 der Photophosphorylierung
  - Untereinheiten I und III des Kopplungsfaktors CF_0 der Photophosphorylierung
  - Polypeptid 4 des Cytochrom b_6
  - Cytochrom f
  - die Polypeptide 1, 2 und 3 des Photosystems II
  - das Apoprotein des Reaktionszentrums P 700

Die bisher bestimmten Informationsgehalte, die von der plastidären DNA kodiert werden, bedecken nur etwa 20 % des Plastoms (Herrmann et al., 1983); die Kapazität des DNA-Moleküls ist bei weitem nicht erschöpft.

Wie schon erwähnt, verfügen die Plastiden über ein eigenes Transkriptionssystem. Die translatierten m-RNAs werden im Gegensatz zu denen des Kerns nicht polyadenyliert. Die nicht polyadenylierten m-RNAs der Plastiden werden nach den bisherigen Erkenntnissen ausschließlich an 70S Ribosomen der Plastiden translatiert. Ein Export der plastidären m-RNAs ins Cytoplasma und eine Translation an 80S Ribosomen konnten ebensowenig nachgewiesen werden wie der Import von polyadenylierter, kernkodierter m-RNA in die Plastiden mit nachfolgender Translation an 70S Ribosomen (Ellis, 1981).

Die Möglichkeit, den Syntheseort plastidärer Enzyme und Polypeptide zu untersuchen, eröffnen unter anderem a) Inhibitorversuche mit Hemmstoffen, die spezifisch die

plastidären 70S Ribosomen bzw. die cytoplasmatischen 80S Ribosomen hemmen (Chloramphenicol bzw. Cycloheximid), b.) die Verwendung 70S ribosomenfreier Zellen oder Blätter. Bei höheren Pflanzen konnten 70S ribosomenfreie Blätter einerseits durch Mutationen (Hagemann und Börner, 1978) und zum anderen durch besondere, für die Bildung der 70S Ribosomen nicht-permissiven Temperaturbedingungen erzeugt werden (Feierabend und Mikus, 1977).

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Bestimmung des Syntheseortes von Enzymen der Lipidsynthese Blätter untersucht, in denen die Bildung von 70S Ribosomen in den Plastiden aufgrund einer erhöhten Anzuchttemperatur völlig unterbunden wurde. Von Hemmstoffversuchen mit 70S und 80S Translationshemmern unterscheidet sich dieses Untersuchungssystem wesentlich: Aufgrund ihrer Wirkungsweise werden die Hemmstoffe in der Regel bei bereits entwickelten Pflanzenteilen eingesetzt. In den Zellen bzw. den Plastiden, die durch Cycloheximid bzw. Chloramphenicol in ihrer Proteinbildung beeinflußt werden, wird nur die Neusynthese von Polypeptiden verhindert, während bereits vorhandene Proteine und Enzymaktivitäten nicht beeinflußt werden. Durch Chloramphenicol wird außer in den Plastiden auch in den Mitochondrien die organelleneigene Proteinsynthese beeinflußt. Dagegen werden in den 70S ribosomenfreien Blättern die Leistungen anderer Zellorganellen nicht beeinträchtigt (Feierabend, 1982). Die Entwicklung des Keimlings erfolgt bereits kurz nach dem Beginn der Keimung bei den Bedingungen, die die Ausbildung von 70S Ribosomen unterdrücken. Die unter nicht-permissiven Temperaturbedingungen gebildeten Blattgewebe besitzen daher vom Zeitpunkt ihrer Entstehung an keine 70S Ribosomen und sind nie zur plastidären Proteinsynthese befähigt.

Die Unterdrückung der Bildung von 70S Ribosomen in den Plastiden höherer Pflanzen durch erhöhte Anzuchttemperaturen wurde von Feierabend und Schrader-Reichhardt (1976) und von Feierabend und Mikus (1977) beschrieben. Die plastidäre Proteinsynthese in den Blättern dieser Pflanzen ist damit vollständig unterbunden, während die cytoplasmatische Proteinsynthese nicht beeinflußt wird (Feierabend und Schrader-Reichhardt, 1976). Die Leistungsfähigkeit anderer Zellorganellen ist in den Keimpflanzen z.B. des Roggens nicht oder nur wenig beeinflußt, das Wachstum der Pflanzen ist normal, solange Reservestoffe aus der Karyopse zur Verfügung stehen. Eine normale Differenzierung der Plastiden zu Chloroplasten ist in Abwesenheit der 70S Ribosomen nicht möglich. Besonders charakteristisch ist, daß diese Plastiden auch im Licht kein Chlorophyll ausbilden. Der Ausfall der plastidären Proteinsynthese scheint zur Folge zu haben, daß die spezifischen Membranpolypeptide der Chlorophyll-Protein-Komplexe fehlen und Chlorophylle nicht in Form dieser Komplexe gebunden und stabilisiert werden können. Das hat zur Folge, daß einerseits die Chlorophyllsynthese unterdrückt wird und zum anderen Chlorophyll bzw. Protochlorophyll(id) leicht photooxidativ zerstört wird (Feierabend, 1977). Das Ausbleichen der Blätter ist daher ein Indiz für das Fehlen der 70S Ribosomen. Die Ursache dafür, daß keine 70S Ribosomen in den chlorotischen Plastiden gebildet werden können, ist nicht bekannt. Die Unfähigkeit 70S Ribosomen zu bilden, ist beim Roggen nicht durch den Verlust von plastidärer DNA begründet. Herrmann und Feierabend (1980) zeigten, daß plastidäre DNA in den chlorotischen 70S ribosomenfreien Blättern vorhanden war und nach der Behandlung mit Restrictionsendonucleasen immer die gleichen Muster entstanden, die auch bei der Behandlung von DNA aus normalen Chloroplasten gebildet wurden. Veränderungen des genetischen Materials der Plastiden durch die

erhöhten Anzuchttemperaturen sind damit auszuschließen. Auch auf einen Verlust oder eine Temperaturempfindlichkeit der RNA-Polymerase der Plastiden ist das Fehlen der 70S Ribosomen in den chlorotischen Primärblättern nicht zurückzuführen, wie Bünger und Feierabend (1980) zeigten. Schon kurze Zeiten, während der die Pflanzen der normalen Anzuchttemperatur von 22°C ausgesetzt sind (60 min pro Tag), reichen aus, um die Ausbildung von 70S Ribosomen zu erlauben (Feierabend, 1977).

Die Plastidenfeinstruktur ist in den chlorotischen 70S ribosomenfreien Plastiden sehr rudimentär; die Plastiden ähneln Proplastiden. Normale Thylakoide werden nicht ausgebildet, es finden sich nur wenige tubuläre Strukturen und Vesikel, die zum Teil in Gruppen liegen und desintegrierten Prolamellarkörpern ähnlich sehen (Schäfers und Feierabend, 1976). Plastoglobuli treten in den chlorotischen Plastiden zuweilen gehäuft auf. Das Plastidenstroma wird durch eine doppelte Hüllmembran vom Cytoplasma abgegrenzt (Schäfers und Feierabend, 1976).

Das System 70S ribosomenfreier Blätter, die durch hohe Wachstumstemperaturen bedingt sind, wird in der vorliegenden Arbeit für Untersuchungen der plastidären Lipidsynthesen eingesetzt. Zunächst wird das Vorkommen und die Akkumulation verschiedener plastidenspezifischer Lipide untersucht, um Anhaltspunkte hinsichtlich der Translationsorte der Enzyme, die für die Synthese dieser Lipide verantwortlich sind, zu erhalten. Werden die Lipide in den 70S ribosomenfreien Blättern gebildet, müssen alle Enzymsysteme ihrer Biosynthesen cytoplasmatischen Ursprungs sein. Als spezifische Komponenten der Etioplasten werden auch Protochlorophyll(id) und Saponine - sie waren zu Beginn dieser Untersuchungen als Bausteine der Prolamellarkörper der Etioplasten angesehen worden - in diese Untersuchungen einbezogen.

Erste Untersuchungen der Glycolipidbildung in 70S ribosomenfreien Blättern von Kosmac (1980) hatten gezeigt, daß die plastidären Glycolipide in diesen Blättern vorhanden sind, aber in erheblich geringeren Mengen vorkommen als in grünen Blättern. Dies ist durchaus zu erwarten, da die normale Differenzierung der Thylakoide verhindert ist. Ähnlich wie in Etioplasten ist der Umfang des inneren Membransystems in den 70S ribosomenfreien Plastiden gegenüber normalen Chloroplasten stark vermindert. Daraus ergibt sich als zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit die Frage nach den Kontrollmechanismen der Bildung plastidärer Lipide. Am Beispiel der Galactolipide wurde untersucht, ob die Lipidsynthese an die Chlorophyllbildung und die Entwicklung von Thylakoidmembranen gekoppelt ist und daher in den ribosomenfreien Plastiden und den Etioplasten reduziert wird. Dazu wurden sowohl die Syntheseraten der Glycolipide und ihre Veränderungen während der Blattentwicklung als auch die Turnoverraten, d.h. die Stabilität, der untersuchten Lipide in normalen grünen, in chlorotischen 70S ribosomenfreien und in etiolierten Blättern durch den Einbau von radioaktiv markiertem Acetat in vivo verglichen. Um Hinweise zu erhalten, an welcher Stelle der Galactolipidbildung die Synthese in den 70S ribosomenfreien Plastiden kontrolliert wird und welche enzymatischen Schritte die Galactolipidsynthese limitieren könnten, wurde die Kapazität zweier wichtiger Teilbereiche der Synthese auch in vitro gemessen und verglichen: die Synthese der Fettsäuren und Glycerolipide aus Acetat und die Galactosylierung von Diglyceriden bzw. Monogalactosyldiacylglycerid zu Mono- bzw. Digalactosyldiacylglycerid.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

Als Pflanzenmaterial wurden Winterroggen (Secale cereale L.) der Sorte Halo (Petkus, Ernte 1981 und 1982) und entspelzte Karyopsen des Gelbhafers (Avena sativa L.) der Sorte Flämingskrone (Petkus, Ernte 1980), verwendet. Das Saatgut wurde an seiner Oberfläche durch Vakuuminfiltration (15 min) mit frischer 3%iger Calciumhydrochloritlösung (30 min) sterilisiert. Die Calciumhypochloritlösung wurde mit vollentsalztem Wasser gründlich ausgewaschen und das Saatgut etwa zwei Stunden vorgequollen. Die Karyopsen wurden in glasbedeckten Plastikschalen (20 x 20 cm) auf Filterpapier (Schleicher & Schüll No. 589) ausgelegt. Das Filterpapier war mit destilliertem Wasser gut angefeuchtet; die Saatdichte betrug etwa 200 Karyopsen je 400 cm^2. Die Pflanzen wurden in den ersten Stunden nach dem Auslegen bei 22°C im Dunkeln gehalten und danach entweder ins Licht bei 22°C oder bei 32°C oder ins Dunkle bei 22°C oder bei 32°C gestellt.

Für die Isolierung größerer Mengen an Vergleichssubstanzen wurden die Pflanzen bei 22°C im Licht oder im Dunkeln auf Vermiculite No. 3 mit modifizierter Knop'scher Nährlösung angezogen (der Hafer wurde hierzu nicht entspelzt). Die Nährlösung enthielt je 1 l:

572 mg $Ca(NO_3)_2$
1430 mg KNO_3
71 mg KCl
143 mg KH_2PO_4
286 mg $MgSO_4 \times 7\ H_2O$
je 1 ml der Lösungen A und B

Lösung A: in 100 ml
695 mg $FeSO_4$ x 7 H_2O
930 mg Na_2-EDTA

Lösung B: in 100 ml
450 mg $MnSO_4$ x H_2O
150 mg $ZnSO_4$ x 7 H_2O
4 mg $CuSO_4$ x 5 H_2O
50 mg Na_2 MoO_4 x 2 H_2O
150 mg H_3BO_4
(nach Feierabend und Schrader-Reichhardt, 1976)

Weißlicht wurde mit Leuchtstoffröhren (Phillips Nr. 32 de luxe und Nr. 47 de luxe im Wechsel) erzeugt. Die Lichtintensität betrug etwa 54,2 W x m^{-2} (5.000 lux). Die Primärblätter des Roggens wurden nach 6 Tagen, die des Hafers nach 8 Tagen geerntet.
Für quantitative Bestimmungen wurden die Blätter, die auf destilliertem Wasser gewachsen waren, in die unteren 2/3 und das obere Drittel zerteilt und die Segmente getrennt weiterverarbeitet.

2. Isolierung der Plastiden

Zur Isolierung der Plastiden wurden das zweite und dritte Sechstel der Primärblätter - von der Basis gerechnet - verwendet. Der Aufschluß des Pflanzenmaterials und die Isolierung der Plastiden wurden nach einer Methode von Höinghaus und Feierabend (1983) durchgeführt. Das Homogenisiermedium war ein 150 mM Tricin-KOH-Puffer pH 7,5, der 10 mM KCl, 1mM $MgCl_2$ x 6 H_2O, 1 mM Na_2-EDTA, 4 mM Dithioerythrit, 0,01% (w/v) Rinderserumalbumin und 350 mM Saccharose oder 330 mM Sorbit als Osmotikum enthielt. Die Plastiden wurden auf Stufengradienten gereinigt. Die Gradientenlösungen enthielten 50 mM Tricin-KOH-Puffer pH 7,5, 1 mM $MgCl_2$ x

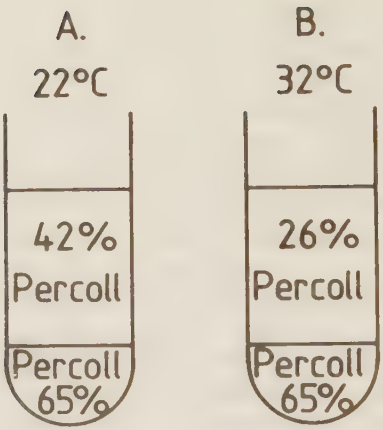


Abb. 4: Zusammensetzung der Percollgradienten zur Reinigung von Chloroplasten (22°C) und 70S ribosomenfreien Plastiden (32°C).

6 H_2O, 1 mM Na_2-EDTA, 10 mM KCl, 4 mM Dithioerythrit und 350 mM Saccharose. Das Kissen (6 ml) des Gradienten enthielt 65% (v/v) Percollgemisch (Pharmacia) und die darüberliegende Stufe (14 ml) 42% (v/v), wenn Chloroplasten aufgetrennt wurden (Abb. 4 A.), bzw. 26% (v/v), wenn chlorotische, 70S ribosomenfreie Plastiden aufgetrennt wurden (Abb. 4 B.). Das verwendete Percollgemisch war mit 3 % (w/v) Polyäthylenglycol 6.000 (Serva) und 1 % (w/v) Rinderserumalbumin versetzt. Auf einem Gradienten wurden Plastiden aus 5 bis 20 g Pflanzenmaterial aufgetragen.

Alle Materialien und Lösungen, die zum Aufschluß

verwendet wurden, waren auf 4°C vorgekühlt. Der Aufschluß und die folgenden Prozeduren wurden bei dieser Temperatur durchgeführt. Die Blattstücke wurden grob zerkleinert und im Homogenisiermedium entweder mit einem Rasierklingenhacker im Eisbad gehackt, oder in einem Haushaltsmixer (Braun Typ 32), der mit Rasierklingenmessern ausgerüstet war (Kannangara et al., 1977) 6 x 1 s aufgeschlossen. Der umgerüstete Haushaltsmixer wurde nur bei Mengen über 50 g Frischgewicht verwendet. Das Homogenat wurde durch vier Lagen Mull und eine Lage Miracloth (Callbiochem) filtriert und bei 2.000 x g die Plastiden sedimentiert. Die Zentrifugationszeit betrug für Chloroplasten 1 min, für chlorotische 70S ribosomenfreie Plastiden 3 min. Die Plastiden wurden in wenigen ml Homogenisiermedium resuspendiert, auf die jeweiligen Gradienten aufgetragen und nach Erreichen von 10.000 Upm in einem SW 28.38 Rotor (Kontron) 1 s (Chloroplasten) bzw. 3 min (70S ribosomenfreie Plastiden) zentrifugiert. Die Bande der intakten Plastiden auf dem 65%igen Percollkissen wurde abpipettiert, mit Homogenisiermedium etwa 1:1 verdünnt und 5 min bei 2.000 x g pelletiert. Die Plastiden wurden in etwa 0,5 ml Homogenisiermedium aufgenommen.

3. Herstellung zellfreier Extrakte

1 g Blattmaterial wurde mit 3 ml Homogenisiermedium (150 mM Tricin-KOH pH 7,5, 10 mM KCl, 1mM $MgCl_2$ x 6 H_2O, 1 mM Na_2-EDTA, 4 mM Dithioerythrit) bei 4°C gemörsert und die Feststoffe bei 20.000 x g 15 min sedimentiert. Der klare Überstand wurde dekantiert und zur Bestimmung von Enzymaktivitäten verwendet.

4. Extraktion der Lipide und Pigmente

4.1. Glycerolipide

Glycerolipide wurden aus dem Gewebe der Primärblätter mit siedendem Chloroform-Isopropanol-Äthanol 2:1:1 nach Kates (1970) extrahiert. Das Pflanzenmaterial (1-5 g Frischgewicht) wurde grob zerkleinert, mit 3 ml des Extraktionsgemisches je g Frischgewicht versetzt und im Virtis 45 Homogenisator 60 s bei maximaler Drehzahl homogenisiert. Der Extrakt wurde auf einer Nutsche von den Feststoffen getrennt und der Filterrückstand mit der gleichen Menge Lösungsmittelgemisch wie oben versetzt. Das Zellwasser wurde in diesem Extraktionsschritt durch halbgesättigte Kochsalzlösung - 0,8 ml pro g Frischgewicht - ersetzt. Die Suspension wurde 15 s mit dem Virtis Homogenisator gemischt und filtriert. Der Filterrückstand wurde mit 1,5 ml Chloroform je ursprünglichem g Frischgewicht nachgewaschen und der Extrakt in einen Scheidetrichter gefüllt.
Um ein zweiphasiges System zu erhalten, wurden weitere 2,5 ml Chloroform und 3 ml halbgesättigte Kochsalzlösung pro g Frischgewicht zugegeben. Nach der Phasentrennung wurde die Chloroformphase in einen Verdampferkolben abgelassen und die wässrige Phase mit Chloroform gewaschen. Der Extrakt wurde bei etwa 40°C am Rotationsverdampfer unter Vakuum eingeengt und mit Benzol getrocknet. Die extrahierten Lipide wurden mit Chloroform-Methanol 2:1 aufgenommen und bei -18°C aufgehoben.

Bei Verwendung sehr geringer Blattmengen (unter 1 g Frischgewicht) wurde das Gewebe im Mörser mit 6 ml Lösungsmittelgemisch (Chloroform-Isopropanol-Äthanol 2:1:1, siedend) je g Frischgewicht aufgeschlossen. Das Homogenat wurde in Zentrifugengläser überführt und der Mörser zweimal mit je 3 ml Lösungsmittelgemisch pro ursprünglichem g Frischgewicht gewaschen. Die Fest-

stoffe wurden aus dem Homogenat durch Zentrifugation (5 min, 3.000 x g) entfernt. Das Sediment wurde mit 6,6 ml Chloroform pro ursprünglichem g Frischgewicht aufgenommen und abzentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt und durch Zugabe von 8,4 ml halbgesättigter Kochsalzlösung pro ursprünglichem g Frischgewicht ein zweiphasiges System gebildet, dessen Chloroformphase unter Vakuum eingedampft wurde. Die Lipide wurden wie oben getrocknet, aufgenommen und aufgehoben. Hypophase abpipettiert, eingeengt und in Chloroform-Methanol 2:1 aufgenommen wurde. Die Lipide wurden wie oben aufgehoben.

Aus gereinigten Plastiden wurden die Lipide nach Folch et al. (1957) extrahiert: je 0,25 ml Plastidensuspension wurden 5 ml Chloroform-Methanol 2:1 zugegeben und gut gemischt. Durch Zugabe von 0,75 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung wurde ein biphasisches System gebildet, dessen Hypophase abpipettiert, eingeengt und in Chloroform-Methanol 2:1 aufgenommen wurde. Die Lipide wurden wie oben aufgehoben.

4.2. Prenylchinone (nach Lichtenthaler und Pfister, 1978 a)

Die Blattsegmente (10-40 g Frischgewicht) wurden grob zerkleinert, pro g Frischgewicht mit je 3 ml 80%igem Aceton versetzt und nach Zugabe einer Spatelspitze Calciumkarbonat im Virtis 45 Homogenisator bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert (60 s). Die Feststoffe wurden entweder mit einer Fritte oder durch Zentrifugation (5 min, 48.000 x g) abgetrennt, und mit der gleichen Menge 80%igem und 100%igem Aceton zweimal nachextrahiert. Die Acetonextrakte wurden in einem Scheidetrichter vereinigt und mit 1 ml 1%igem wässrigem Kaliumhexacyanoferrat versetzt (Oxidation von Plasto-

hydrochinon zu Plastochinon). Nach einer Minute wurden 15 bis 20 ml Petroläther (K_p: 50 - 70°C) zugegeben und gut gemischt. Mit halbgesättigter Kochsalzlösung wurde das gesamte Flüssigkeitsvolumen verdoppelt, um eine Phasentrennung zu erreichen. Die wässrige Acetonphase wurde abgelassen; die organische Phase wurde mit halbgesättigter Kochsalzlösung und mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Petrolätherphase wurde mit 1 bis 2 g Natriumsulfat versetzt und zusätzlich über eine kurze Säule aus Natriumsulfat (1 x 3 cm) getrocknet. Der Petrolätherextrakt wurde eingedampft und in 5 ml Petroläther (K_p: 50 - 70°C) aufgenommen. Die Extrakte wurden bei -18°C aufgehoben.

4.3. Protochlorophyll(id)

Das Blattmaterial (2 - 5 g) wurde mit 2,5 ml 85%igem Aceton pro g Frischgewicht im Virtis Homogenisator eine min bei höchster Drehzahl aufgeschlossen, und die Feststoffe durch Filtration oder Zentrifugation (10 min, 3.000 x g) entfernt (Anderson und Boardman, 1964).

4.4 Saponine (nach Kesselmeier und Budzikiewicz, 1979)

Die Primärblätter bzw. Blatteile (2 - 5 g Frischgewicht) wurden grob zerkleinert und in einem Virtis 45 Homogenisator mit 3 ml 80%igem Aceton pro g Frischgewicht bei höchster Geschwindigkeit etwa 1 min homogenisiert. Die festen Bestandteile wurden mit einer Fritte abgetrennt. Die Rückstände wurden mit 80%igem und mit 100%igem Aceton (jeweils 3 ml pro ursprünglichem g Frischgewicht) nachextrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt, zur Trockne eingeengt und in Chloroform-Methanol-Wasser (70:30:4) aufgenommen.

Abb. 5: Teilung der Primärblätter des Roggens zur Untersuchung des Einbaus radioaktiv markierter Vorstufen in vivo und in vitro und Bezeichnung der verwendeten Segmente.

Plastiden bzw. deren Membranen wurden bei 48.000 x g 15 min sedimentiert und das Sediment in 80%igem Aceton resuspendiert. Die unlöslichen Substanzen wurden bei 48.000 x g abzentrifugiert und mit 80%igem und 100%igem Aceton nachextrahiert. Die Extrakte wurden gemeinsam zur Trockne eingeengt und in Chloroform-Methanol-Wasser 70:30:4 aufgenommen.

5. Einbau radioaktiver Vorstufen

5.1. Einbau von ^{14}C-Acetat in Blattsegmente

Von den Primärblättern des Roggens wurden das erste, zweite und dritte Sechstel (Abb. 5) zur Inkubation verwendet.
Je 10 Blattsegmente wurden in Petrischalen von 35 mm

Durchmesser mit 0,5 ml Inkubationslösung gelegt. Die Lösung enthielt 0,01% (v/v) Tween 20 und 10 μCi (= 370 kBq) U-^{14}C-Acetat (57,9 μCi/μMol = 2,14 MBq/μMol) in destilliertem Wasser. Die Blattstücke wurden 30 s im Vakuum infiltriert und drei Stunden unter den gleichen Bedingungen, unter denen die Pflanzen gewachsen waren, inkubiert. Danach wurden die Blattstücke mit destilliertem Wasser gewaschen und sofort die Lipide extrahiert.

Bei Chase-Experimenten wurden die Blattsegmente am Ende der Einbauzeit gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in Petrischalen mit 50 mM nicht radioaktiver Natriumacetatlösung pH 6,5, die 0,01% (v/v) Tween 20 enthielt, gelegt und 30 s im Vakuum infiltriert. Die Lösung wurde weiterhin nach 2, 4, 8 und 12 Stunden gewechselt. Die Blatteile wurden während des Chases bei der gleichen Temperatur inkubiert, bei der sie gewachsen waren.

Zum Einbau von ^{14}C-Acetat in Anwesenheit von 4,6-Dioxoheptansäure, eines Hemmstoffs der Chlorophyllsynthese, wurde das dritte Segment (Abb. 5) von Primärblättern, die bei 22°C im Licht gewachsen waren, verwendet. Die Blattsegmente wurden halbiert und für 40 min in Petrischalen (35 mm Durchmesser) mit 0,49 ml wässriger 10 mM Dioxoheptansäure, die 0,01% Tween 20 enthielt, gelegt. Nach dieser Zeit wurden 10 μCi (= 370 kBq) U-^{14}C-Acetat (57,9 μCi/μMol = 2,14 MBq/μMol) zugesetzt und weitere drei Stunden inkubiert. Die gesamte Prozedur wurde bei 22°C im Licht durchgeführt. Die weitere Verarbeitung der Blattstücke erfolgte wie oben beschrieben.

5.2. Glycerolipidsynthese aus ^{14}C-Acetat in vitro

Intakte Plastiden aus 1 bis 3,5 g Blattgewebe (entsprechend einer Aktivität von 1 - 50 nMol x min $^{-1}$ der NADP-abhängigen Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase) wurden 30 min bei 25°C im Dunkeln in einem Medium inkubiert, das in einem Gesamtvolumen von 0,25 ml 330 mM Sorbit, 2 mM $MgCl_2$ x 6 H_2O, 2 mM $MnCl_2$ x 4 H_2O, 0,25 mM KH_2PO_4, 10 oder 100 mM $KHCO_3$, 50 mM Tricin-KOH pH 7,6, 0,5 mM Dithioerythrit, 0,17 mM UDP-Galactose, 1,5 mM ATP, 0,25 mM Coenzym A, 0,2 mM Thiaminpyrophosphat, 0,5 mM Glycerin-3-Phosphat und 0,16 mM (2,3 μCi = 85 kBq) U-^{14}C-Acetat (57,9 μCi/μMol = 2,14 MBq/μMol) enthielt (Roughan et al., 1979a; McKee und Hawke, 1979; Mudd und Dezacks, 1981; Wintermans et al., 1984).
In einem zweiten Ansatz wurden die Plastiden ohne Sorbit aber mit zusätzlich 0,5 mM NADH und 0,5 mM NADPH inkubiert.
Der Einbau des radioaktiven Acetats wurde durch Zugabe von 5 ml Chloroform-Methanol (2:1) gestoppt. Die Extraktion wurde wie oben beschrieben nach Folch et al. (1957) durchgeführt.

5.3. Galactolipidsynthese aus UDP-^{14}C-Galactose in vitro

In 0,25 ml eines Mediums, das 330 mM Sorbit, 50 mM Tricin-KOH-Puffer pH 7,6, 0,25 mM KH_2PO_4, 2 mM $MgCl_2$ x 6 H_2O, 2 mM $MnCl_2$ x 4 H_2O, 0,5 mM Dithioerythrit, 10 mM $KHCO_3$, 0,16 mM Natriumacetat, 0,5 mM Glycerin-3-Phosphat und 0,17 mM UDP-^{14}C-Galactose (2 μCi/μMol = 74 kBq/μMol) enthielt, wurden die Plastiden aus etwa 1 bis 3,5 g Blattgewebe (NADP-abhängige Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase-Aktivität zwischen 1 und 50 nMol x min^{-1}) inkubiert (Roughan et al., 1979a; McKee und Hawke, 1979; Mudd und Dezacks, 1981; Wintermans et al., 1984,

Gillanders und Mackender, 1984). Die Inkubation dauerte 20 min und wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln ausgeführt.
In einem zweiten Ansatz wurden aufgebrochene Plastiden (ohne Sorbit als Osmoticum) inkubiert.
Die Inkubationsansätze wurden durch Zugabe von 5 ml Chloroform-Methanol (2:1) gestoppt und wie oben beschrieben weiterverarbeitet.

6. Verseifung der Glycerolipide und Methylierung der Fettsäuren (nach Müller und Göke, 1973)

Nach Auftrennung der Lipide auf Dünnschichtplatten wurden sie mit dem Kieselgel ausgekratzt und in Reaktionsgefäße überführt. Gesamtextrakte wurden direkt in die Reaktionsgefäße pipettiert und die Lösungsmittel mit Stickstoff abgedampft. Mit 4,5 ml 0,5 M methanolischer KOH wurden die Lipide 30 min unter Rückfluß bei 70°C verseift. Nichtverseifbare Substanzen wurden mit n-Hexan (2 x 5 ml) ausgeschüttelt. Verseifbare Substanzen wurden durch Zugabe von 0,25 ml rauchender Salzsäure aus ihren Salzen verdrängt. Im Anschluß wurde entweder mit n-Hexan (2-5 x 5 ml) ausgeschüttelt oder es wurden durch Zugabe von 1,25 ml methanolischer Bortrifluorid-Lösung (14%) und weiteres Kochen bei 70°C unter Rückfluß (10 min) die Fettsäuren in ihre Methylester überführt. Die Fettsäuremethylester wurden zweimal mit 5 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Die Hexanextrakte wurden bei 40°C am Rotationsverdampfer eingeengt. Die Proben wurden mit n-Hexan aufgenommen und unter Stickstoff bei -18°C aufgehoben.

7. Chromatographische Verfahren

7.1. Reinigung von Glycolipiden durch Säulenchromatographie (nach Kates, 1972)

Zur Darstellung von Vergleichssubstanzen wurden MGDG, DGDG und SQDG aus einem Extrakt grüner Primärblätter des Roggens durch Säulenchromatographie gewonnen.

Kieselgel 60, feiner als 230 mesh (Merck), wurde über Nacht im Trockenschrank bei 110°C getrocknet. 15 g Kieselgel wurden in Chloroform aufgeschlämmt, eine Säule von 1,8 x 13,5 cm gegossen und mit ca. 100 ml Chloroform gewaschen. Durch Stickstoffdruck wurde die Laufgeschwindigkeit auf 80 ml x h^{-1} x cm^{-2} reguliert. Ein frisch bereiteter Lipidextrakt aus 25 g Blattmaterial, der in 5 ml Chloroform aufgenommen war, wurde auf die Säule aufgetragen, und unter Stickstoffdruck nacheinander mit 175 ml Chloroform, 600 ml Aceton und 175 ml Methanol eluiert. Die Eluate mit Chloroform, Aceton und Methanol wurden getrennt gesammelt, eingeengt und in je 5 ml Chloroform aufgenommen. Die Acetonfraktion wurde auf eine DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen.

15 g Säulenmaterial (DEAE-Cellulose, Serva, Typ DEAE 23 SS, Kapazität 0,72) wurden über Nacht in Eisessig vorgequollen und in eine Säule (1,8 x 25 cm) gefüllt. Der Eisessig wurde mit Stickstoffdruck herausgepreßt, die Säule mit 180 ml Methanol, 150 ml Methanol-Chloroform (1:1) und 200 ml Chloroform gewaschen. Die Glycolipide, die in der aufgetragenen Acetonfraktion der Kieselgelsäule enthalten waren, wurden mit 480 ml Chloroform-Methanol 98:2 (MGDG), 600 ml Chloroform-Methanol 9:1 (DGDG), 600 ml Methanol und 600 ml Chloroform-Methanol 4:1, in dem 2,3 g Ammoniumacetat gelöst waren, (SQDG) eluiert. Die Laufgeschwindigkeit wurde

mit Stickstoffdruck auf etwa 85 ml x h^{-1} x cm^{-2} geregelt, es wurden Fraktionen von 12 - 18 ml gesammelt.
Die Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf ihre Zusammensetzung untersucht, und Fraktionen gleichen Inhalts vereinigt und eingeengt.

7.2. Reinigung der 26 Desglucoavenacoside durch Säulenchromatographie (mod. nach Kesselmeier und Budzikiewicz, 1979)

Zur Reinigung der Desglucoavenacoside wurden die Primärblätter etiolierter Haferkeimlinge, die bei 22°C gewachsen waren mit 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5, der 5 mM NA_2-EDTA enthielt, in einem Waring Blendor homogenisiert. Das Homogenat wurde durch vier Lagen Mull und eine Lage Miracloth (Calbiochem) filtriert. Die Membranen wurden bei 34.000 x g 10 min abzentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit 80%igem und einmal mit 100%igem Aceton extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt, zur Trockne eingedampft und in Chloroform-Methanol-Wasser 70:30:4 aufgenommen. Aus diesem Membranextrakt wurden die Desglucoavenacoside mit Diäthyläther (Lösungsmittelgemisch-zu Diäthyläther etwa 1:2) ausgefällt, bei 12.000 x g 20 min abzentrifugiert und in Chloroform-Methanol-Wasser 70:30:4 aufgenommen. Die so vorgereinigten Desglucoavenacoside wurden auf eine Kieselgelsäule (Kieselgel 60 feiner 230 mesh, Merck) (3 x 52 cm), die mit Chloroform-Methanol-Wasser 70:30:4 äquilibriert war, aufgetragen und mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit wurde mit Stickstoffdruck auf 8,5 ml x h^{-1} x cm^{-2} geregelt. Die Reinigung und Auftrennung der Desglucoavenacoside wurde über Dünnschichtchromatographie verfolgt. Fraktionen gleichen Inhalts wurden vereinigt, zur Trockne eingeengt und in Chloroform-Methanol-Wasser 70:30:4 aufgenommen.

26-Desglucoavenacosid A wurde zwischen 700 und 850 ml, 26-Desglucoavenacosid B zwischen 1150 und 1400 ml eluiert. Die gereinigten Desglucoavenacoside wurden mittels Dünnschichtchromatographie auf Verunreinigungen untersucht. Der Nachweis erfolgte dabei durch Veraschung mit Schwefelsäure. Die Menge der gewonnenen Desglucoavenacoside wurde gravimetrisch bestimmt.

7.3. Trennung der Glycolipide durch Dünnschichtchromatographie

Die Glycolipide wurden auf Fertigplatten Kieselgel 60 mit oder ohne Konzentrierungszone, Schichtdicke 0,25 mm (Merck) aufgetrennt.
Als Laufmittel für eindimensionale Chromatogramme wurde die Hypophase eines Gemisches aus 60 ml Chloroform, 80 ml Methanol und 40 ml 1%iger wässriger Ammoniaklösung verwendet (Kesselmeier, pers. Mitteilung).
Bei zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie war das erste Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser 65:25:4, das zweite Laufmittel Chloroform-Methanol-2-Aminopropan-7N Ammoniumhydroxid 65:35:0,5:5 (Allen und Good, 1971).

7.4. Auftrennung der Galactolipide nach ihrer Fettsäurezusammensetzung

Die Lipide der Blattextrakte wurden auf Kieselgel 60 Fertigplatten eindimensional mit Chloroform-Methanol-Wasser 65:25:4 aufgetrennt. Die jeweiligen Lipidbanden wurden ausgekratzt, nachdem sie im Randbereich der Platte mit Orcin-Schwefelsäure angefärbt worden waren. Das lipidhaltige Kieselgel wurde mit 5 ml Chloroform-Methanol 2:1 suspendiert. Um eine Desaktivierung des Kieselgels und eine Phasentrennung zu erreichen, wurde

1 ml destilliertes Wasser zugegeben, gut geschüttelt und 5 min bei 3.300 x g zentrifugiert (Slack et al., 1977). Die Chloroformphase wurde abpipettiert, eingeengt und in Chloroform-Methanol 2:1 aufgenommen. DGDG wurde erneut auf Kieselgel 60 Dünnschichtplatten aufgetragen und mit Chloroform-Methanol-2-Aminopropan-7N Ammoniumhydroxid 65:35:0,5:5 aufgetrennt, um Verunreinigungen durch Phospholipide zu beseitigen.

Zur Auftrennung von MGDG und DGDG in ihre molekularen Formen nach der Desaturierung ihrer Fettsäuren, wurden Dünnschichtplatten mit Kieselgel G 60, das 25% Silbernitrat enthielt (Lem und Williams, 1978), hergestellt. 30 g Kieselgel G 60 wurden dazu mit 70 ml Wasser, das 7,5 g Silbernitrat enthielt, aufgeschlämmt und auf Glasplatten ausgestrichen. Die Kieselgelschicht hatte eine Dicke von 0,25 mm. Die Platten wurden bei 110°C aktiviert und unter Vakuum über Calciumchlorid im Dunkeln maximal eine Woche aufgehoben.

MGDG wurde auf den mit Silbernitrat imprägnierten Platten mit Chloroform-Methanol-Wasser 65:25:4, DGDG mit Chloroform-Methanol-Wasser 60:30:4 chromatographiert (Lem und Williams, 1978).
Die verschiedenen Formen der Galactolipide, die sich in ihrer Fettsäuredesaturierung unterscheiden, wurden nach Besprühen der Platte mit Rhodamin 6 G im UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht.

7.5. Dünnschichtchromatographie von Fettsäuremethylestern (nach Russel und Harwood, 1979)

Die Fettsäuremethylester wurden auf selbstgefertigten Dünnschichtplatten, die mit Kieselgel H 60 (Merck), das 12,5 % (w/w) Silbernitrat enthielt, aufgetrennt. Die Schichtdicke der Platten betrug 0,25 mm. Die Platten

wurden möglichst frisch gegossen, bei 110°C 30 min aktiviert und dunkel im Exsikkator über Trockenmittel aufgehoben.
Als Laufmittel wurde Petroläther (K_p 50 -70°C)-Diäthyläther (wasserfrei) 9:1 verwendet. Der Nachweis der Fettsäuremethylester erfolgte mit Rhodamin 6 G.
Als Vergleichssubstanzen wurden Fettsäuremethylester der Stearinsäure, Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure, Palmitinsäure und cis-Hexadecensäure (alle Sigma) verwendet.

7.6. Dünnschichtchromatographie der Prenylchinone

Die Prenylchinone wurden auf Fertigplatten Kieselgel 60 (Merck), Schichtdicke 0,25 mm, aufgetrennt. Das Laufmittel bestand aus Petroläther (K_p 50-70°C) und wasserfreiem Diäthyläther im Verhältnis 100:16,5 (Lichtenthaler, 1977). Die Prenylchinone wurden mit Rhodamin B oder dem Reagenz nach Emmerie und Engel (1943) nachgewiesen.

7.7. Dünnschichtchromatographie der Saponine

Die Trennungen wurden auf Fertigplatten Kieselgel 60 (Merck) durchgeführt. Als Laufmittelgemisch wurde Chloroform-Methanol-Wasser 70:30:4 (Kesselmeier und Budzikiewicz, 1979) verwendet. Nach der ersten Chromatographie wurden die Platten 5 min getrocknet und ein zweites Mal im gleichen Laufmittelgemisch in der gleichen Richtung chromatographiert.

8. Nachweismethoden

8.1. Allgemeine Nachweise

Als allgemeines Nachweisreagenz diente 25%ige Schwefelsäure. Organische Substanzen wurden durch Veraschung bei 110°C angefärbt.

Mit Jod waren alle ungesättigten Lipide durch Anlagerung an die Doppelbindung anfärbbar. Die Dünnschichtplatten wurden dazu mit der Schichtseite nach unten über einige Jodkristalle gelegt. Lipidflecken färbten sich gelbbraun (Kates, 1972; Krebs et al., 1960).

Als chemisch inerte allgemeine Nachweisreagenzien wurden Rhodamin B und Rhodamin 6 G eingesetzt. Die Platten wurden mit einer 0,005%igen Lösung in 80%igem Methanol besprüht (10 ml je 20 x 20 cm Platte) und unter UV-Licht (366 nm) ausgewertet. Hintergrundfluoreszenz ließ sich durch Besprühen mit 80%igem Methanol verringern (Lichtenthaler et al., 1977; Kates, 1972; Krebs et al., 1960)

8.2. Nachweis von Glycolipiden

Die Platten wurden mit einer 0,1%igen Orcinlösung in 2 N Schwefelsäure besprüht und im Trockenschrank auf 110°C erhitzt (Moczar, 1973). Zuckerhaltige Lipide erschienen purpurn; leicht veraschbare Substanzen färbten sich schwach braun.

8.3. Nachweis von Steroiden und Saponinen

Die Dünnschichtplatten wurden mit Chloroform, in dem Antimontrichlorid bis zur Sättigung gelöst war, angesprüht und im Trockenschrank bei 110°C 10 bis 15

min bis zur optimalen Farbentwicklung erhitzt. Steroidhaltige und saponinhaltige Flecken zeigten sich purpurn (Krebs et al., 1960)

8.4. Nachweis von α-Tocopherol und Plastochinon-9

Beide Benzochinone ließen sich durch Besprühen mit 0,005%igem äthanolischem Rhodamin B sichtbar machen. Ebenso wie Vitamin K_1 (Phyllochinon), zeigten sie sich als schwach blauviolette Banden auf rosafarbenem Untergrund (Lichtenthaler et al., 1977).

α-Tocopherol wurde zusätzlich nach der Methode von Emmerie und Engel (1943) nachgewiesen. Die Platte wurde mit einem Gemisch aus gleichen Teilen einer 0,2%igen Eisen-III-Chlorid-Lösung in Äthanol und einer 0,5%igen α,α -Dipyridyllösung in Äthanol eingesprüht. α-Tocopherol färbte sich rosa auf weißem Untergrund.

8.5. Nachweis von Phyllochinon

Phyllochinon (Vitamin K_1) ließ sich ohne weitere Vorbehandlung durch seine Grünfluoreszenz bei Bestrahlung mit UV-Licht von 366 nm Wellenlänge eindeutig identifizieren (Lichtenthaler et al., 1977).

8.6. Fluorographie von Dünnschichtchromatogrammen

Die Dünnschichtchromatogramme wurden mit En^{3}Hance (New England Nuclear) angesprüht, möglichst schnell mit Kodak X-OMAT S Filmen abgedeckt und zwischen einem und 7 Tagen bei -80°C exponiert. Die Filme wurden mit Adefo-Entwickler (Adefo-Chemie, Nürnberg, 1 Teil

Entwicklerkonzentrat + 4 Teile Wasser) 6 min bei 20°C entwickelt und mit Adefofix (Adefo-Chemie, Nürnberg, 700 ml Wasser + 250 ml Fixierer + 50 ml Härter) 5 min fixiert.

9. Quantitative Bestimmungsmethoden

9.1. Quantitative Glycolipidbestimmung

9.1.1. Densitometrische Messung der Glycolipide

Lipidextraktmengen, die 4-20 mg Blattfrischgewicht entsprachen, wurden als möglichst kleine Flecken auf Kieselgel Fertigplatten aufgetragen und mit Eichsubstanzen von MGDG, DGDG und SQDG eindimensional mit Chloroform-Methanol-1%iger Ammoniaklösung 60:80:40 (Hypophase) chromatographiert (Kesselmeier pers. Mitteilung).
Die Glycolipide wurden mit Orcin (Moczar, 1973) sichtbar gemacht und densitometrisch mit einem Quick Scan R & D (Helena Laboratories, Beaumont, Texas, USA) bestimmt. Die Einstellung des Gerätes war wie folgt: Filter 545 nm, größter Schlitz (5 x 0,5 mm), scan speed 100, detector voltage 300, analog gain 500, paper speed high, mode direkt und function log.
Eichreihen wurden mit Reinsubstanzen für MGDG- und DGDG zwischen 500 und 2800 ng und für SQDG zwischen 70 und 400 ng aufgenommen. Die Lipidgehalte der verwendeten Eichlösungen waren nach Dubois (1956) mit Phenol-Schwefelsäure und Galactose als Eichzucker bestimmt worden.

9.1.2. Bestimmung des Zuckeranteils der Glycolipide mit Phenol-Schwefelsäure (nach Dubois, 1956)

Die Lipidextrakte wurden auf selbstgefertigten Kieselgel G 60 Platten (Schichtdicke 0,25 mm) zweidimensional aufgetrennt. Eichlösungen wurden auf Kieselgel 60 Fertigplatten eindimensional aufgetrennt. Die Flecken wurden mit Jod sichtbar gemacht und markiert. Das Jod wurde mit einem Fön ausgetrieben, die Flecken ausgekratzt und das Kieselgel in Reagenzgläser überführt. Ebenso wurden von jeder Platte vier Flecken aus dem Randbereich ausgekratzt, um als Leerwert zu dienen.
Das Kieselgel wurde in 2 ml Wasser aufgeschlämmt. Dazu wurde 1 ml einer 5%igen Phenollösung pipettiert und auf einem Mixomat (Boskamp) geschüttelt. Nach Zugabe von 5 ml konzentrierter Schwefelsäure wurde erneut gründlich gemischt. Nach etwa 10 min wurde das Kieselgel 5 min bei 3.300 x g abzentrifugiert und nach 30 min die Extinktion des Überstands bei 490 nm gemessen. Die Färbung blieb für mehr als eine Stunde stabil. Eine Eichkurve mit Galactose als Standard wurde im Bereich von 0 bis 80 µg Galactose aufgenommen. Zur Umrechnung der Galactosemenge auf µg Glycolipid in den Proben wurden folgende Umrechnungsfaktoren verwendet: für MGDG 4,255, für DGDG 2,801 und für SQDG 3,413.

9.2. Quantitative Bestimmung der Saponine

Zur quantitativen Bestimmung wurden die Saponine aus Blattextrakten aufgetrennt und mit Antimontrichlorid angefärbt. Auf den Dünnschichtplatten wurden bekannte Mengen der 26-Desglucoavenacoside als Eichsubstanzen cochromatographiert. Unmittelbar nach dem Erhitzen wurden die Platten mit einem Diafilm (Kodak) photographiert. Die Diapositive wurden bei 625 nm mit einem Gilford-Spektralphotometer A 240, das mit einem

Film-scaning Adapter ausgestattet war, densitometrisch gemessen. Die Peakflächen wurden auf Pergamentpapier übertragen, ausgeschnitten und gewogen. Eichreihen mit Desglucoavencosid A und B wurden im Bereich von 0 bis 20 ng auf die gleiche Weise aufgenommen.

9.3. Quantitative Bestimmung der Prenylchinone

0,2 bis 0,5 ml der Extrakte wurden auf Kieselgel 60 Fertigplatten aufgetrennt und die jeweiligen Banden ausgekratzt. Die Benzochinone wurden mit 2 bis 3 ml Äthanol aus dem Kieselgel eluiert, und dieses über eine Fritte abgetrennt.

9.3.1. Quantifizierung von Plastochinon-9

Für die Plastochinonbestimmung wurde die Extinktionsdifferenz zwischen oxidierter und reduzierter Form bei 255 nm ausgenutzt. Durch Zugabe eines Tropfens frisch hergestellter 1%iger KBH_4-Lösung wurde das Plastochinon in seine reduzierte Form, das Plastohydrochinon, überführt. Die Plastochinonkonzentration wurde mit der von Lichtenthaler et al. (1977) angegebenen Konstante berechnet: $E_{255nm}\ {}^{1\%}_{1cm} = 230$.

9.3.2. Quantitative Bestimmung von α-Tocopherol

α-Tocopherol wurde nach der Methode von Emmerie und Engel (1943) bestimmt. 1 ml des alkoholischen Eluats wurde mit je 1 ml 0,05%iger α,α-Dipyridyllösung (äthanolisch) und 0,02%iger $FeCl_3$-Lösung (äthanolisch) versetzt und die Extinktion bei 520 nm 2 min nach Zugabe der Reagenzien gemessen. Die Konstante für die

Berechnung der Konzentration von α-Tocopherol war: $E_{520nm}\ 1\%_{1cm} = 407$ (Lichtenthaler et al., 1977).

9.3.3. Quantitative Bestimmung von Phyllochinon

Die Phyllochinonkonzentration der Extrakte wurde nach einer Methode von Lichtenthaler et al. (1977) in abgewandelter Form bestimmt. 10 bis 30 μl der Extrakte wurden in möglichst kleinen Flecken auf Kieselgel 60 Fertigplatten aufgetragen. Auf jeder Platte wurden Flecken mit bekannten Mengen Phyllochinon (Vitamin K_1, Sigma) mitchromatographiert. Die charakteristische Grünfluoreszenz des Phyllochinons wurde mit einer UV-Lampe (366 nm, Chromato-Vue Transilluminator, Ultra Violet Products Inc., USA) 2 min angeregt und danach in einem Quick Scan R&D (Helena Laboratories, Beaumont, Texas, USA) mit einer 366 nm Lichtquelle gemessen. Das Gerät war folgendermaßen eingestellt: scan speed 50, paper speed high, analog gain 1000, mode inverse, function linear und detector voltage 1000. Eine Eichkurve wurde im Bereich 0 bis 0,5 μg Vitamin K_1 aufgenommen.

9.4. Quantitative Bestimmung von Protochlorophyll(id)

Zur quantitativen Bestimmung von Protochlorophyll(id) wurden von den Extrakten Absorptionsspektren im Bereich von 400 bis 700 nm aufgenommen. Die Extinktionen bei 700, 663, 645 und 626 nm wurden aus den Spektren bestimmt und die Protochlorophyll(id)gehalte nach der bei Anderson und Boardman (1964) angegebenen Formel $29{,}6 \times E_{626nm} - 3{,}99 \times E_{663nm} - 6{,}76 \times E_{645nm} = \mu g/ml$ bestimmt. Zur Erstellung der Spektren wurde ein Uvikon 810 Spektralphotometer (Kontron) verwendet.

9.5. Quantitative Bestimmung des Chlorophylls

10 Blatteile wurden mit etwa 0,5 ml 80%igem Aceton und einer Spatelspitze $CaCO_3$ gemörsert. Das Homogenat wurde in ein Reagenzglas überführt und Mörser und Pistill mit insgesamt etwa 3,5 ml 80%igem Aceton mehrfach gespült. Die Waschlösungen wurden mit dem Homogenat vereinigt und gut geschüttelt. Die Feststoffe wurden bei 3.300 x g 10 min sedimentiert und der Chlorophyllgehalt des Überstands nach der Formel $0{,}0202 \times E_{645\ nm} + 0{,}00802 \times E_{663nm}$ = mg/ml bestimmt (Arnon, 1949).

9.6. Messung der Radioaktivität durch Flüssigkeitsszintillation

Szintillationsmessungen wurden im Betascint BF 5000 (Berthold, Wildbad) und im Tri-Carb 4530 (Packard Instrument Company, Illinois, USA) bei 4°C durchgeführt. Bei der Bestimmung der dpm-Werte wurde im Beta-Scint mit internem Standard (5500 dpm ^{14}C-Toluol) gearbeitet; im Tri-Carb wurde die Ausbeute über den 'Spectral Index of Sample' bestimmt.
Gemessen wurden die Proben in mini vials der Firma Zinsser mit 4 ml Packard Emulsifier Scint 299 als Szintillationscocktail. Die Proben wurden maximal 20 min gemessen. Bei Proben, die vor Beendigung der maximalen Meßzeit 20.000 Zerfälle erreicht hatten, wurde die Messung an dieser Stelle beendet.

9.7. Bestimmung von Enzymaktivitäten

9.7.1. NADP-abhängige Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase

Die Aktivität des Enzyms wurde in folgendem Testansatz bestimmt (Feierabend, 1969):

0,30 ml H_2O
0,45 ml 1 M Tris-HCl-Puffer mit 5mM Na_2-EDTA pH 8,5
0,01 ml 0,5 M $MgCl_2$ x 6 H_2O
0,05 ml 0,1 M Cystein
0,05 ml 0,05 M ATP
0,02 ml 0,006 M NADPH
0,02 ml Phosphoglycerat Kinase (Boehringer) (1 mg/ml)
0,05 ml Extrakt
Die Reaktion wurde mit 0,05 ml 0,2 M 3-Phosphoglycerat gestartet; die Oxidation des NADPH wurde bei 340 nm gemessen.

9.7.2. NAD-abhängige Malat Dehydrogenase

Die Aktivität des Enzyms wurde nach Feierabend und Schrader-Reichardt (1976) in folgendem Testansatz bei 25°C bestimmt:
2,89 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer ph 7,6
0,05 ml 12 mM NADH
0,01 ml Extrakt
Die Reaktion wurde mit 50 μl 50 mM Oxalacetat pH 6,8 gestartet; die Oxidation des NADH wurde bei 340 nm gemessen.

III. ERGEBNISSE

1. Beschreibung des experimentellen Systems

Zur Untersuchung der Bildung von Glycolipiden, Prenylchinonen und Chlorophyllen wurden die Primärblätter von Roggenpflanzen, zur Untersuchung der Saponinbildung die Primärblätter von Haferkeimlingen verwendet,die bei der erhöhten Temperatur von 32°C gewachsen waren. Die waren, enthielten in ihren Plastiden 70S Ribosomen. Das interkalare Wachstum der Getreideblätter mit einem Meristem an den Blattbasen bedingte, daß die Zellen mit 70S Ribosomen in ihren Plastiden auf die Spitzen der Blätter (oberes Drittel) beschränkt waren. Die basalen zwei Drittel der Primärblätter waren 70S ribosomenfrei. Sichtbares Indiz hierfür war bei Pflanzen, die im Licht gewachsen waren, das Ergrünen der Blattspitzen, während die basalen Teile der Blätter völlig chlorotisch waren. Aussagen über die Beteiligung von 70 S Translationsprodukten an der Synthese der plastidären Lipide sind nur durch die Untersuchung völlig 70S ribosomenfreier Blatteile möglich. Die Primärblätter wurden daher bei allen Versuchen - auch bei etiolierten 70S ribosomenfreien Blättern und bei den Blättern grüner und etiolierter Kontrollpflanzen - in oberes Drittel und untere zwei Drittel geteilt. Die Segmente wurden getrennt aufgearbeitet und analysiert.

2. Analyse der qualitativen und quantitativen Lipidzusammensetzung

2.1. Protochlorophyll(id)

Rademacher und Feierabend (1976) hatten in den 70S ribosomenfreien Blättern untersucht, ob Carotinoide und Chlorophylle gebildet werden. Während etwa 30% des Gehaltes normaler grüner Blätter an Carotinoiden in den 70S ribosomenfreien Blatteilen nachzuweisen waren, fanden sich nur Spuren von Chlorophyllen. Feierabend (1977) untersuchte daher die Chlorophyllsynthese in den chlorotischen Abschnitten der Primärblätter und kam zu dem Schluß, daß die Synthese der Chlorophylle a) durch eine feedback-Hemmung der Synthese der δ-Aminolävulinsäure gehemmt war, und daß b) Protochlorophyll(id) nach Inkubation dieser Blattsegmente mit δ-Aminolävulinsäure im Dunkeln gebildet werden konnte, im Licht aber photooxidiert wurde. Die Fähigkeit einer Bildung des Protochlorophyll(id)s in etiolierten Blatteilen, und damit die Frage, ob der erste Schritt der Chlorophyllsynthese, die δ-Aminolävulinsäuresynthese, in den 70 S ribosomenfreien Plastiden funktioniert, wurde nicht untersucht.

Wie Abb. 6 zeigt, ist in den etiolierten, 70S ribosomenfreien Teilen von Primärblättern des Roggens Protochlorophyll(id) enthalten. Das Absorptionsspektrum zeigt ein deutlich ausgeprägtes Maximum bei 626 nm, das für Protochlorophyll(id) charakteristisch ist.
Etwa 40% des Protochlorophyll(id)s, das in den unteren zwei Dritteln etiolierter Blätter permissiver Wachstumsbedingungen (22°C) gebildet wurde, war in den 70S ribosomenfreien Blatteilen vorhanden (Tabelle 2). Ein direkter Einfluß der erhöhten Temperatur auf die Enzyme, die an der Bildung des Protochlorophyll(id)s beteiligt sind, ist auszuschließen, da in den Spitzen

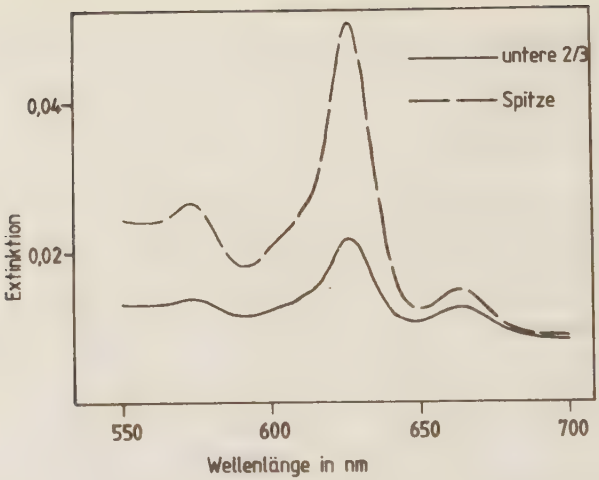


Abb. 6: Absorptionsspektrum eines Acetonextraktes aus den basalen Segmenten von Primärblättern des Roggens, der unter nicht-permissiven Bedingungen im Dunkeln gewachsen war.

Anzuchtbedingung	Blatteil	Protochlorophyll(id) ng/Blatteil	%
22°C etioliert	oberes 1/3	299 ± 9	100
	untere 2/3	198 ± 15	100
32°C etioliert	oberes 1/3	212 ± 4	71
	untere 2/3	81 ± 4	41

Tabelle 2: Konzentration und Verteilung von Protochlorophyll(id) in den Primärblättern von Roggenpflanzen, die unter permissiven (22°C) und nicht-permissiven Bedingungen (32°C) gewachsen waren.

der Primärblätter bei beiden Anzuchttemperaturen ähnliche Mengen des Pigments nachgewiesen wurden (Tabelle 2).

Da auch in den Blattsegmenten, die vollständig frei von plastidären 70S Ribosomen sind, Protochlorophyll(id) gebildet wurde, müssen die Polypeptide aller Enzyme der Chlorophyllsynthese, die zur Bildung von Protochlorophyll(id) benötigt werden, außerhalb der Plastiden gebildet und in die Plastiden transportiert werden.

In den 70S ribosomenfreien Etioplasten sind keine Prothylakoide aber wohlausgebildete Prolamellarkörper vorhanden (Feierabend et al., 1969). Das Protochlorophyll(id), das in den 70S ribosomenfreien Blättern vorkommt, muß also in den Prolamellarkörpermembranen lokalisiert sein.

2.2. Saponine

Untersuchungen von Rademacher und Feierabend (1976) an Roggenblättern hatten gezeigt, daß bei einer Erhöhung der Anzuchttemperatur auf 32°C vermehrt Sterylglycoside gebildet werden. Kesselmeier und Ruppel (1979) und Kesselmeier und Budzikiewicz (1979) hatten zwei (26-Desgluco)-Avenacoside (Abb. 3), Glycoside des Nuatigenins (Tschesche und Schmidt, 1966), als strukturbestimmende Substanzen der Prolamellarkörper beschrieben. Kesselmeier und Ruppel (1979) belichteten etiolierte Blätter und fanden in ihren Plastiden eine rasche Abnahme der Saponingehalte.
Von diesem zu Beginn der Untersuchungen vorliegenden Wissensstand ausgehend, wurde in den 70S ribosomenfreien Blättern von Haferpflanzen, die bei permissiven (22°C) und nicht-permissiven (32°C) Wachstumstemperaturen im Licht oder im Dunkeln angezogen worden waren,

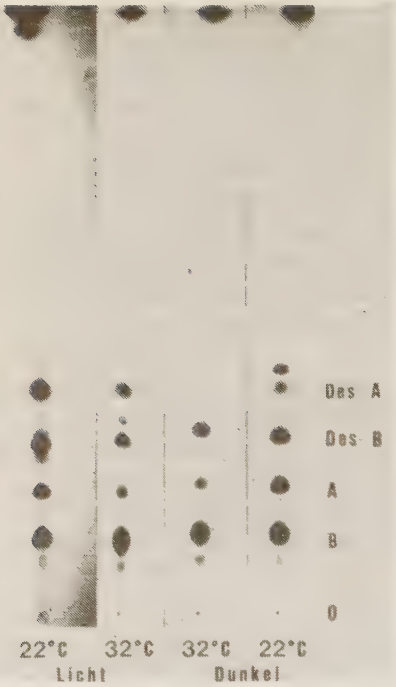


Abb. 7: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Rohextrakten aus Primärblättern des Hafers, der bei verschiedenen Anzuchtsbedingungen gewachsen war.

Laufmittel: Chloroform-Methanol-Wasser 70:30:4, zweimal in der ersten Dimension entwickelt.

Nachweis der Saponine mit Antimontrichlorid

Abkürzungen: A - Avenacosid A, B - Avenacosid B, Des-A - 26-Desglucoavenacosid A, Des-B - 26-Desglucoavenacosid B, 0 - Start

die Saponinbildung untersucht, um einerseits die Abhängigkeit der Saponinbildung von 70S Translationsprodukten zu untersuchen und andererseits festzustellen, in wie weit die tubulären und vesikulären inneren Membranstrukturen der chlorotischen 70S ribosomenfreien Plastiden auch im Licht noch eine Lipidausstattung aufweisen, die die Prolamellarkörper der Etioplasten kennzeichnen.

In den Extrakten aus Primärblättern des Hafers wurden bei Anzucht der Pflanzen bei 22°C oder bei 32°C im Dunkeln, aber auch im Licht, beachtliche Mengen der Avenacoside A und B sowie ihrer 26-Desglucoderivate gefunden (Abb. 7); im Licht wurde doppelt so viel

Anzucht-bedingungen	Blatteil	A + Des-A µg/Blatteil	%	B + Des-B µg/Blatteil	%	Summe der Saponine µg/Blatteil
22°C Licht	oberes 1/3	13,3	40	19,9	60	33,2
	untere 2/3	9,2	19	38,0	81	47,2
32°C Licht	oberes 1/3	6,2	16	31,5	84	37,7
	untere 2/3	9,8	21	33,9	79	43,7
32°C Dunkel	oberes 1/3	8,6	26	21,3	74	29,9
	untere 2/3	4,7	20	14,7	80	19,4
22°C Dunkel	oberes 1/3	12,1	35	22,6	65	34,7
	untere 2/3	5,3	21	19,8	79	25,1

Tabelle 3: Gehalt und Verteilung der Avenacoside und 26-Desglucoavenacoside in den Primärblättern des Hafers unter verschiedenen Anzuchtbedingungen.
Angaben in µg je Blattsegment bzw. in % des gesamten Saponingehaltes im jeweiligen Blatteil

Abkürzungen: A + Des-A - Summe von Avenacosid A und 16-Desglucoavenacosid A,
B + Des-B - Summe von Avenacosid B und 26-Desglucoavenacosid B

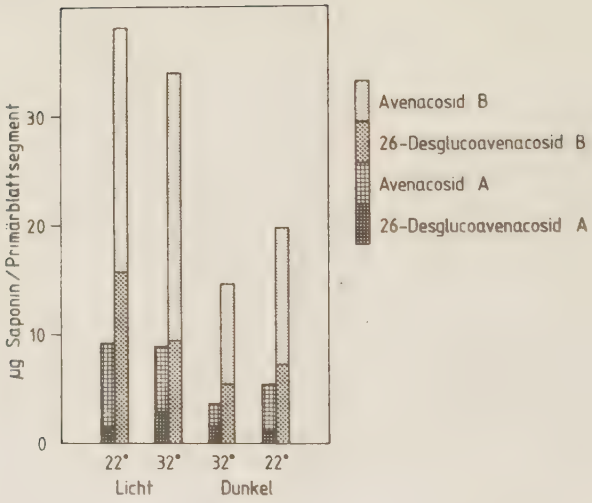


Abb. 8: Saponingehalte in den basalen Teilen (untere 2/3) der Primärblätter des Hafers unter verschiedenen Anzuchtbedingungen.

Saponin gebildet wie im Dunkeln (Tabelle 3, Abb. 8). Da die 26-Desglucoavenacoside, wie inzwischen von Kesselmeier (1982) gezeigt wurde, während der Extraktion durch enzymatische Abspaltung der β-glycosidisch gebundenen Glucose am C_{26} des F-Ringes gebildet werden und die benutzte Extraktionsmethode dem noch nicht Rechnung trägt, ist es bei der weiteren quantitativen Analyse nur sinnvoll, die Summen des jeweiligen Avenacosids und seines Desglucoderivates zu betrachten. Die Gruppen werden im weiteren Saponin A und Saponin B genannt.

Die Summe der Saponine A und B war in den Primärblättern, die im Licht gewachsen waren, unabhängig von den Anzuchttemperaturen, zu 40% auf das obere und zu 60%

auf die basalen zwei Drittel der Blätter verteilt. In etiolierten Primärblättern war die Verteilung umgekehrt (Tabelle 3). Die Verhältnisse von Saponin A und B waren in den basalen Teilen der Blätter bei allen Anzuchtbedingungen nahezu identisch (Tabelle 3). Die Verhältnisse in den Spitzen der Blätter waren bei permissiver Wachstumstemperatur (22°C) zugunsten von Saponin A verschoben. Bei nicht-permissiver Temperatur war in Blättern, die im Dunkeln gewachsen waren, ebenfalls mehr Saponin A als Saponin B vorhanden; im Licht wurde dagegen das stärker glycosylierte Saponin B verstärkt synthetisiert.

Die Bildung der Saponine und ihre Akkumulation wurde durch den Ausfall der plastidären Proteinsynthese nicht wesentlich beeinträchtigt. Die Ausbildung der Saponine war keineswegs spezifisch auf Wachstum im Dunkeln und die Ausbildung von Prolamellarkörpern beschränkt. Vielmehr wurde im Licht doppelt so viel Saponin in den basalen Teilen der Blätter gebildet wie im Dunkeln. Die Korrelation, die Kesselmeier und Ruppel (1979) zwischen Saponingehalt und Prolamellarkörperentwicklung an Plastidenmembranen fanden, konnte durch diese Untersuchungen über die Gesamtmengen der Saponine an den Primärblättern nicht bestätigt werden. Sie ziehen vielmehr die generelle Bedeutung der Saponine für den Prolamellarkörperaufbau in Zweifel. Dieser Zweifel wurde auch dadurch verstärkt, daß im Roggen, der gut ausgebildete Prolamellarkörper enthält, keine Saponine nachgewiesen werden konnten (Kosmac, 1980). Neueste Untersuchungen von Kesselmeier und Urban (1983), die nach der Isolierung von Organellen aus Protoplasten des Hafers eine Lokalisation der Saponine zum Ziel hatten, zeigten inzwischen auch, daß die Saponine in der Vakuole lokalisiert sind. Es fanden sich dort ausschließlich Avenacosid A und B. Kesselmeier und Urban (1983) wiesen nach, daß die 26-Desglucoavenacoside durch eine - wahrscheinlich im Tonoplasten vorhandene -

β-Glucosidase bei der Zerstörung der Vakuole gebildet werden können und sehr rasch an die Prolamellarkörper binden.

2.3. Prenylchinone

Aus der Gruppe der Prenylchinone sind drei Vertreter ausschließlich innerhalb der Plastiden lokalisiert: In den Plastiden grüner wie etiolierter Pflanzen sind Plastochinon-9 und α-Tocochinon, ihre Hydrochinone, α-Tocopherol (Vitamin E) und Phyllochinon (Vitamin K_1) enthalten (Lichtenthaler, 1977).
Die Synthese sowohl des chinoiden Ringes als auch der Prenylseitenketten findet innerhalb der Plastiden statt (Bickel et al., 1978; Löffelhardt und Kindl, 1979; Soll et al., 1980a und 1980b; Block und Douce, 1980). Wie bei den Saponinen und dem Chlorophyll stellt sich hier die Frage, ob Enzyme der Synthesewege auch innerhalb der Chloroplasten synthetisiert werden.
Beide Benzochinone und das Naphthochinon waren in 70S ribosomenfreien Blatteilen, die im Licht oder im Dunkeln gewachsen waren, vorhanden (Tabelle 4, Abb. 9). Ihre Syntheseenzyme setzen sich damit nur aus Polypeptiden zusammen, die an 80S Ribosomen translatiert werden. In grünen Primärblättern des Roggens, der bei permissiver Wachstumstemperatur (22°C) angezogen worden war, wurden ähnliche Chinongehalte nachgewiesen (Tabelle 4) wie sie von Lichtenthaler (1969) für Gerstenblätter berichtet wurden. Die Prenylchinone sind in den Primärblättern ebenso asymetrisch verteilt wie Protochlorophyll(id) und Saponine. Etwa 45% des Plastochinon-9 und des Phyllochinons und 37% des α-Tocopherols sind in dem oberen Drittel der grünen Blätter vorhanden (Tabelle 4). Die asymetrische Verteilung der Prenylchinone auf Spitzen und basale Teile war in den etiolierten Primärblättern permissiver

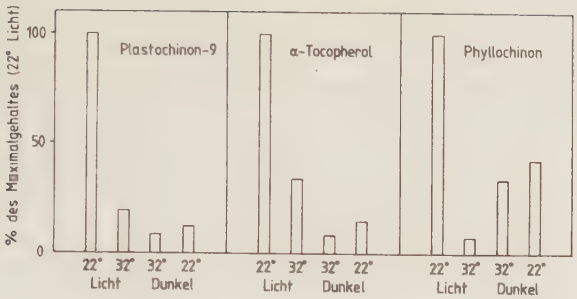


Abb. 9: Relative Gehalte der Prenylchinone in den basalen Segmenten der Primärblätter des Roggens bei verschiedenen Wachstumstemperaturen.

Anzuchtbedingungen (22°C) weit ausgeprägter als in den Blättern, die im Licht gewachsen waren. Etwa 65% der Benzochinone und 44% des Naphthochinons waren in den oberen Teilen der Blätter lokalisiert. Eine Speicherung der Prenylchinone in den Plastoglobuli scheint hierfür verantwortlich zu sein. Der Absolutgehalt an Prenylchinonen war in den etiolierten Primärblättern weit niedriger als in den Blättern belichteter Keimlinge (Tabelle 4). In den unteren zwei Dritteln wurden nur zwischen 10 und 40% dessen gebildet, was in den basalen Teilen grüner Kontrollen nachzuweisen war (Abb. 9). Die Prenylchinongehalte der 70S ribosomenfreien Blattsegmente von etiolierten Blättern, die bei 32°C gewachsen waren, lagen in der gleichen Größenordnung wie bei den Segmenten etiolierter Blätter (22°C). In Blättern, die bei 32°C im Licht gewachsen waren, waren die Gehalte der beiden Benzochinone in den unteren zwei Dritteln der Blätter auf 20 bis 35 % der Gehalte grüner Blätter verringert. Das Phyllochinon war in diesen Segmenten nur in sehr geringer Menge (7,5 % grüner Kontrollen) nachzuweisen. Da der Phyllochinongehalt bei 32°C im

Anzuchtbedingungen	Blattsegment	Plastochinon-9* ng/Segment	α-Tocopherol ng/Segment	Phyllochinon ng/Segment
22°C Licht	oberes 1/3	733 ± 65	310 ± 61	47,5 ± 7,7
	untere 2/3	896 ± 18	524 ± 172	64,2 ± 10,4
32°C Licht	oberes 1/3	434 ± 67	302 ± 47	19,5 ± 5,3
	untere 2/3	172 ± 31	178 ± 29	4,8 ± 0,8
32°C Dunkel	oberes 1/3	167 ± 30	89 ± 21	24,9 ± 4,6
	untere 2/3	77 ± 22	44 ± 3	21,6 ± 5,7
22°C Dunkel	oberes 1/3	174 ± 20	157 ± 26	20,5 ± 4,7
	untere 2/3	108 ± 19	76 ± 17	27,5 ± 4,3

Tabelle 4: Gehalt der Prenylchinone Plastochinon-9, α-Tocopherol und Phyllochinon in den Primärblättern des Roggens, der bei permissiver (22°C) oder nicht-permissiver (32°C) Temperatur im Licht oder im Dunkeln gewachsen war.

Licht weit geringer war als bei 32°C im Dunkeln, könnte eine Photodestruktion des Phyllochinons im Licht in den chlorotischen 70S ribosomenfreien Blättern ein möglicher Grund für die niedrige Konzentration sein; weitere Untersuchungen sind in dieser Richtung nötig, wurden aber im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

2.4. Glycolipide

Die Frage nach dem Syntheseort der Enzyme für die Glycolipidsynthese in den Primärblättern ist von Kosmac (1980) bereits bearbeitet worden. 70S Ribosomen sind an der Synthese dieser Enzyme nicht beteiligt. Allerdings blieb diese erste Analyse (Kosmac, 1980) noch unvollständig. Etiolierte Blätter und Zusammenhänge mit der Chlorophyllbildung wurden noch nicht oder wenig beachtet und es wurden auch nicht durchgängig nur gleichwertige Blatteile (untere Segmente) verglichen. Daher wurde die vergleichende Analyse der Glycolipide hier nochmals überarbeitet und vervollständigt.

In den Primärblättern war für die Glycolipide MGDG, DGDG und SQDG eine deutlich ausgeprägte asymetrische Verteilung entlang der Blattachse feststellbar. In den Blättern permissiver Wachstumsbedingungen (22°C) wurden im Licht ebenso wie im Dunkeln in den oberen Dritteln etwa 50% des Glycolipidgehaltes des ganzen Blattes nachgewiesen; in den Blättern, die unter nicht-permissiven Bedingungen gewachsen waren, enthielten die Spitzen etiolierter Blätter 55%, die Spitzen chlorotischer Blätter nahezu 70% des gesamten Glycolipidgehaltes der Blätter (Tabelle 5).

Die relative Verteilung des gesamten Glycolipidgehaltes auf die einzelnen Glycolipide war in grünen oder etiolierten Blättern, die bei 22°C gewachsen waren, in

Anzucht-bedingungen	Blatt-segment	MGDG µg/Blatt-segment	%	DGDG µg/Blatt-segment	%	SQDG µg/Blatt-segment	%	Summe µg/Blatt-segment	MGDG/DGDG
22°C Licht	oberes 1/3	32,9	54	25,1	41	2,8	5	60,8	1,31
	untere 2/2	36,4	54	27,5	41	3,9	6	67,8	1,32
32°C Licht	oberes 1/3	19,8	49	19,3	47	1,6	4	40,7	1,03
	untere 2/3	7,6	43	9,1	51	1,0	6	17,7	0,83
32°C Dunkel	oberes 1/3	6,7	40	9,2	55	0,7	4	16,6	0,72
	untere 2/3	5,7	41	7,0	51	1,1	8	13,8	0,82
22°C Dunkel	oberes 1/3	11,8	49	11,3	47	1,2	5	24,3	1,05
	untere 2/3	11,3	48	11,1	47	1,3	5	23,7	1,01

Tabelle 5: Gehalt der Glycolipide in den Primärblättern des Roggens unter verschiedenen Anzuchtbedingungen.

Angaben in µg/Blattsegment bzw. in % der Summe der Glycolipide

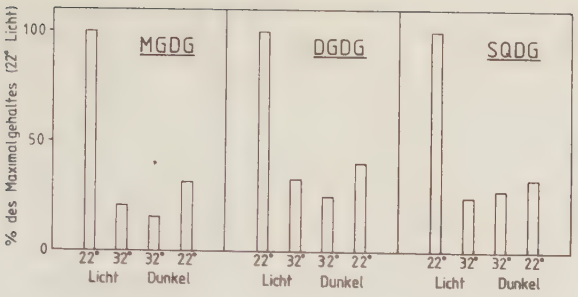


Abb. 10: Relative Gehalte der Glycolipide in den basalen Segmenten (untere 2/3) der Primärblätter von Roggenkeimlingen, die bei verschiedenen Wachstumsbedingungen angezogen wurden.

den unteren zwei Dritteln und dem oberen Drittel jeweils charakteristisch gleich (Tabelle 5). Das Verhältnis von MGDG zu DGDG war in den etiolierten Blatteilen zugunsten des DGDG verschoben, wie auch von Tevini (1977) von anderen etiolierten Geweben berichtet wurde. Die absoluten Glycolipidgehalte waren in den etiolierten Blatteilen gegenüber grünen Blattstücken drastisch verringert: In den etiolierten basalen Blatteilen wurden für MGDG 31%, DGDG 40% und SQDG 33% des Galactolipidgehaltes grüner Blattsegmente gemessen (Abb. 10).

In den unteren zwei Dritteln 70S ribosomenfreier Primärblätter, die im Licht bzw. im Dunkeln gewachsen waren, wurden Glycolipidgehalte gleicher Größenordnung nachgewiesen (Tabelle 5). Die Konzentration der einzelnen Glycolipide erreichte kaum die Höhe der Konzentrationen, die in entsprechenden Blattsegmenten etiolierter Kontrollpflanzen enthalten waren (Abb. 10). Das Verhältnis der beiden Galactolipide (MGDG zu DGDG) ist in den basalen 70S ribosomenfreien Segmenten

der Primärblätter, die im Licht oder im Dunkeln gewachsen waren, mit 0,83 in die Nähe des Verhältnisses von 0,3 bis 0,8 verschoben, das von Douce und Joyard (1979) für Chloroplastenhüllmembranen angegeben wird. Die Glycolipidgehalte der chlorotischen 70S ribosomenfreien Segmente waren gleich hoch (Sulfolipid) oder um 1/3 höher (Galactolipide) als die der etiolierten 70S ribosomenfreien Blattsegmente. Ein Einfluß des Phytochromsystems, wie er von Unser und Mohr (1970) beschrieben wurde, könnte für diesen Anstieg verantwortlich sein.
In den Spitzen der Primärblätter, die bei der nichtpermissiven Temperatur von 32°C gewachsen waren, war eine weit größere Steigerung der Lipidakkumulation durch den Einfluß des Lichts nachzuweisen, da in diesen Blatteilen auch noch Chlorophyll gebildet wurde und aufgrund der Anwesenheit von 70S Ribosomen auch ein Aufbau von Thylakoidmembranen möglich war. Es wurde in diesen Blattsegmenten eine 2,4-fach höhere Konzentration akkumuliert als in den Blattspitzen etiolierter 70S ribosomenfreier Blätter (vergl. Tabelle 5).

Charakteristisch für die Membranlipide der Chloroplasten - insbesondere für MGDG und DGDG ist ein sehr hoher Gehalt an Linolensäure, der im MGDG bis zu über 90% betragen kann (Dorne et. al., 1982; Heinz, 1977; Ryberg et al., 1983). Die Fettsäuresubstituenten an C_1 und C_2 des Glyceringrundgerüstes beeinflussen das physikalische Verhalten der Glycerolipide entscheidend. So kann die Fluidität der Membranen durch das Lipid-Protein-Verhältnis (Chapman et al., 1983) aber auch durch den Grad der Sättigung der Fettsäurereste (Cronan und Gelman, 1975) veränderten Temperaturen angepaßt werden.
Die Desaturierungsreaktionen, die zur Bildung von Linolensäure führen, sind zum Teil in den Plastiden lokalisiert (Stumpf, 1980; Roughan und Slack, 1982);

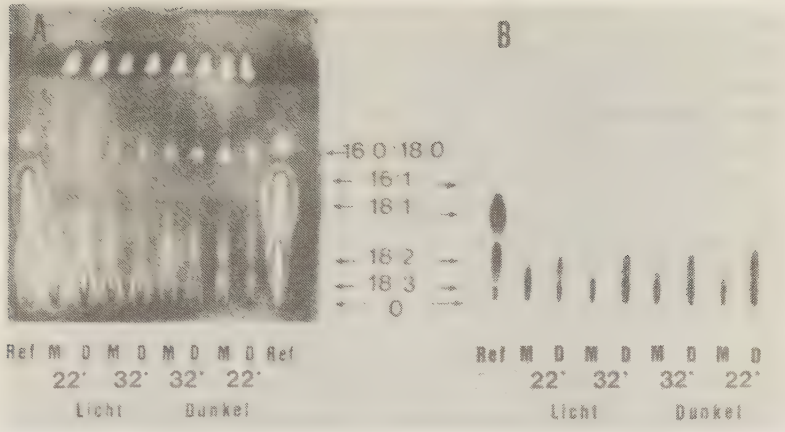


Abb. 11: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Fettsäuremethylestern aus Mono- (M) und Digalactosyldiacylglycerid (D) aus den Extrakten von Primärblättern des Roggens (basale 2/3), der unter verschiedenen Anzuchtbedingungen gewachsen war.

Auftrennung an Kieselgel H, das mit 12,5 % Silbernitrat imprägniert war.

Laufmittel: Petroläther (K_p 50-70°)-Diäthyläther 9:1

Nachweis der Fettsäuremethylester mit Rhodamin 6 G im UV-Licht bei 366 nm (A) und 25%iger Schwefelsäure (B)

Als Referenzen (Ref.) mit bekanntem Sättigungsgrad wurden die Fettsäuremethylester folgender Fettsäuren aufgetrennt:
Stearinsäure (18:0), Ölsäure (18:1), Linolsäure (18:2), Linolensäure (18:3), Palmitinsäure (16:0), Hexadecensäure (16:1).

Mit Schwefelsäure ließen sich die gesättigten Fettsäuren nicht darstellen; bei Anfärbung mit Rhodamin 6 G ist die Linolensäure (18:3) aus aufnahmetechnischen Gründen gegenüber den gesättigten Fettsäuren unterrepräsentiert. Die deutlich größeren Mengen Linolsäure im DGDG verglichen mit der Linolsäure im MDGD in B ist dadurch begründet, daß dieses DGDG mit Phosphatidylethanolamin verunreinigt war.

nicht bekannt ist, durch welches Translationssystem die dazu benötigten Enzyme bereitgestellt werden.
Eine rein qualitative Analyse der Fettsäuren der Galactolipide aus den Extrakten von Primärblättern des Roggens wurde durchgeführt, um festzustellen, ob trotz des Verlustes plastidärer Proteinsynthese in den 70S ribosomenfreien Blättern die Desaturierung der Fettsäuren hier im gleichen Umfang durchgeführt wird wie in grünen Blättern.

Im Licht oder im Dunkeln gewachsene Blattsegmente (basale 2/3) von Roggenprimärblättern enthalten bei beiden Anzuchttemperaturen (22°C und 32°C) in ihrem MGDG vorwiegend dreifach ungesättigte Fettsäuren und nur wenige Fettsäuren mit höherem Sättigungsgrad (Abb. 11). DGDG aus den Extrakten basaler Blatteile von Pflanzen, die bei den vier verschiedenen Anzuchtbedingungen gezogen wurden, enthielt gesättigte, ein-, zwei- und dreifach ungesättigte Fettsäuren; die Linolensäure stellte den größten Teil der Fettsäurereste des DGDG (Abb. 11)

Die Muster des MGDG und DGDG mit Fettsäuren unterschiedlichen Desaturierungsgrades waren bei Extrakten aus Primärblättern, die bei erhöhter Temperatur gewachsen waren, nicht verschieden von denen aus Blatteilen von Primärblättern permissiver Wachstumsbedingungen (Abb. 12). Im Licht und im Dunkeln wurden die gleichen Muster gefunden. In beiden Galactolipiden herrschten Moleküle vor, die dreifach ungesättigte Fettsäuren sowohl an C_1 und C_2 des Glyceringrundgerüstes tragen (Abb. 12).

In den Blattsegmenten, deren 70S Translationssystem durch die erhöhte Wachstumstemperatur gestört ist, werden dennoch die plastidenspezifischen Glycolipide gebildet. Sie enthalten in diesen Blattabschnitten

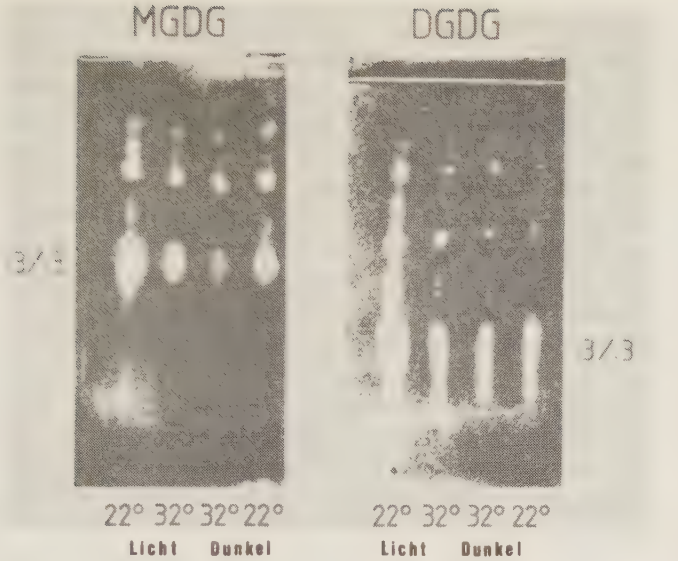


Abb. 12: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von MGDG und DGDG nach ihrem Sättigungsgrad auf Silbernitrat-imprägniertem (25%) Kieselgel. Untersucht wurden Extrakte von Roggenkeimlingen (basale 2/3 der Primärblätter), die unter permissiven (22°C) oder nicht-permissiven (32°C) Bedingungen gewachsen waren.

Laufmittel: für MGDG: Chloroform-Methanol-Wasser 65:25:4, für DGDG: Chloroform-Methanol-Wasser 60:30:4

Nachweis mit Rhodamin 6 G im UV-Licht (366 nm)

ebenso wie in Blattstücken von Kontrollpflanzen vorwiegend Linolensäure. Die Enzyme, die für die Galactolipidsynthese und die Desaturierung der Fettsäuren verantwortlich sind, müssen also an 80S Ribosomen translatiert werden, und soweit die Reaktionen innerhalb der Plastiden ablaufen, dorthin transportiert werden.

Vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich des Glycolipidgehaltes und der Fettsäurezusammensetzung der Galactolipide erhielten Dorne et al., (1982) durch die Unter-

suchung einer 70S ribosomenfreien Gerstenmutante. Die Konzentration der einzelnen Glycolipide waren in den Blättern der Gerstenmutante gegenüber den Kontrollen stärker vermindert, als es die Gehalte der einzelnen Glycolipide in den 70S ribosomenfreien Blattsegmenten des Roggens gegenüber denen der Segmente grüner Roggenblätter waren. Die überwiegende Fettsäure der Galactolipide in den Gerstenmutanten war wie in den 70S ribosomenfreien Blättern des Roggens die Linolensäure, Linolsäure stellte einen nur geringen Anteil.

3. Regulation der Galactolipidakkumulation

Die bisherigen Ergebnisse haben die qualitative und quantitative Zusammensetzung der plastidären Lipide in den Primärblättern von Roggenkeimlingen bei verschiedenen Differenzierungszuständen der Plastiden beschrieben. Wenn die normale Membrandifferenzierung der Chloroplasten entweder durch das Fehlen von Licht (Etioplasten) oder durch das Fehlen von 70S Translationsprodukten (chlorotische Plastiden) blockiert war, blieben die plastidären Glycolipidmengen geringer als in normalen grünen Blättern. Daraus stellte sich die Frage, durch welche Mechanismen die Akkumulation der Membranlipide, z.B. der Galactolipide, in den chlorotischen 70S ribosomenfreien Blatteilen auf etwa 30% der Menge beschränkt wurde, die in grünen Blattsegmenten vorhanden ist. Eine Regulation ist einerseits durch Verringerung der Synthese, z.B. über die Verminderung der Aktivität bestimmter Enzyme des Fettsäure- oder Glycerolipidstoffwechsels, oder durch die Erhöhung des Turnovers der Galactolipide zu erreichen. Die an der Bildung der Galactolipide beteiligten Teilschritte sind Fettsäuresynthese, Desaturierung der Fettsäuren, Diglyceridbildung und Galactosylierung der Diglyceride. Jeder einzelne Abschnitt der Synthese könnte für die

Verminderung der Galactolipide in chlorotischen Blatteilen gegenüber grünen Blättern verantwortlich sein.

3.1. Vergleich der Synthese von Fettsäure und Glycerolipiden in Blattsegmenten verschiedenen Entwicklungsalters.

Durch interkalares Wachstum mit basalem Meristem weisen Blätter von monokotylen Pflanzen einen Altersgradienten entlang der Blattachsen auf. Entlang dieses Altersgradienten konnten Hawke et al. (1974) und Bolton und Harwood (1978) stark unterschiedliche (mit zunehmendem Alter der untersuchten Segmente bis etwa zur Blattmitte hin ansteigende) Einbauraten von ^{14}C-Acetat in die Glycerolipide feststellen. In den folgenden Untersuchungen wurde diese Altersabhängigkeit ausgenutzt und die Synthese der Fettsäuren und Glycerolipide während der Differenzierung der Plastiden in drei aufeinander folgenden Segmenten aus den unteren Hälften der Primärblätter des Roggens untersucht. Die Segmente hatten eine durchschnittliche Länge von 2 cm; das basale Segment, das die meristematische Zone enthielt, wurde als Segment I, die beiden zur Blattspitze hin folgenden Segmente als Segment II bzw. III bezeichnet (vergl. Abb. 5).

Die Analyse des Gesamteinbaus von ^{14}C-Acetat in Fettsäuren, gemessen als lipophile verseifbare Substanzen der Lipidextrakte, zeigte, daß die jüngsten Segmente (I), die bei der permissiven Wachstumstemperatur von 22°C im Licht oder im Dunkeln gewachsen waren, hinsichtlich ihrer Einbauraten sehr verschieden waren. Etiolierte Blattstücke inkorporierten nur etwa 12 % der Radioaktivität, die in belichteten Segmenten eingebaut wurde (Abb. 13, Tabelle 6). Mit zunehmendem

I. Segment	Licht 22°C	Licht 32°C	Dunkel 22°C
verseifbare lipophile Substanz	126.200	92.600	14.900
Summe der Glycolipide	5.440	4.370	910
Summe der Phospholipide	62.300	27.000	3.110
MGDG / DGDG	2,97	1,56	1,73
Phospholipide / Glycolipide	11,45	6,18	3,42
II. Segment			
verseifbare lipophile Substanz	108.200	53.800	58.800
Summe der Glycolipide	6.780	2.040	2.760
Summe der Phospholipide	74.000	20.200	20.100
MGDG / DGDG	3,95	2,32	3,44
Phospholipide / Glycolipide	10,91	9,90	7,28
III. Segment			
verseifbare lipophile Substanzen	217.100	44.200	59.400
Summe der Glycolipide	14.200	2.360	2.910
Summe der Phospholipide	146.900	22.800	31.800
MGDG / DGDG	4,79	2,34	3,79
Phospholipide / Glycolipide	10,35	9,66	10,93

Tabelle 6: Einbau von radioaktivem Acetat in Blattsegmenten (siehe Abb. 5) der Primärblätter des Roggens, der bei permissiven Bedingungen (22°C) im Licht oder im Dunkeln oder bei nicht-permissiven Bedingungen (32°C) im Licht gewachsen war.

Angaben in dpm ^{14}C-Einbau je Blattsegment

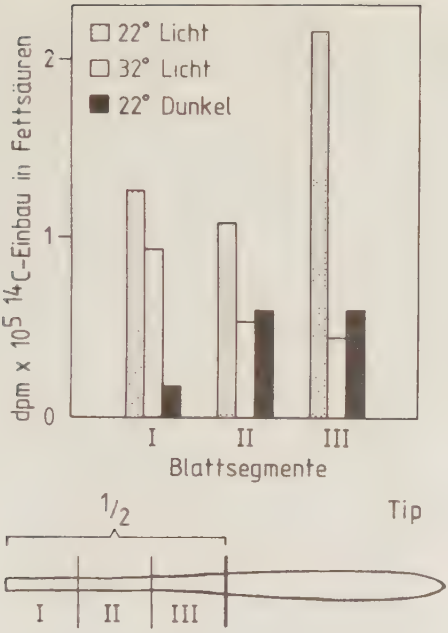


Abb. 13: Einbau von ^{14}C-Acetat in die gesamten Fettsäuren der Primärblätter von Roggenkeimlingen, die bei permissiven (22°C) Bedingungen im Licht oder im Dunkeln oder bei nicht-permissiven (32°C) Bedingungen im Licht gewachsen waren.

Alter der Segmente ergab sich bei der permissiven Wachstumstemperatur in den belichteten Primärblättern folgendes: die Einbaurate des ^{14}C-Acetats im II. Segment war in der gleichen Größenordnung wie im I. und stieg im III. Segment auf das 1,7-fache der Einbaurate im jüngsten Segment an (Abb. 13). In den etiolierten Kontrollpflanzen zeigte sich, daß bereits im II. Segment eine höhere Einbaurate als im I. vorhanden war. Der Anstieg der Einbaurate gegenüber der

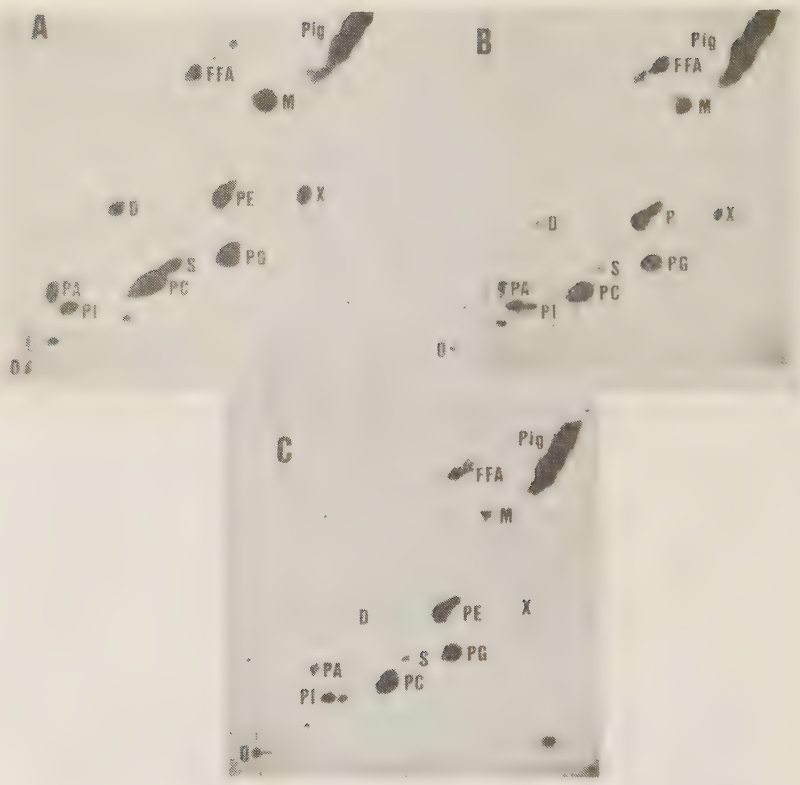


Abb. 14: Autoradiogramme von Dünnschichtchromatogrammen der Extrakte aus den III. Segmenten (siehe Abb. 5) von Primärblättern des Roggens, der bei permissiver Temperatur (22°C) im Licht (A) oder im Dunkeln (B) oder bei nicht-permissiver Temperatur (32°C) im Licht (C) gewachsen war.

Laufmittel: vertikal - Chloroform-Methanol-Wasser 65:25:4 horizontal - Chloroform-Methanol-2-Aminopropan-7N Ammoniumhydroxid 65:35:0,5:5

Abkürzungen: M - Monogalactosyldiacylglycerid, D -Digalactosyldiacylglycerid, S - Sulfochinovosyldiacylglycerid, PG - Phosphatidylglycerin, PC - Phosphatidylcholin, PE -Phosphatidylethanolamin, PA - Phosphatidsäure, PI -Phosphatidylinosit, FFA- freie Fettsäuren, X - unbekannt, Pig - Pigmente + Diglyceride u.a.m., O - Start

des jüngsten Blattsegments war 4-fach; es wurden etwa 54% der Einbaurate des II. Segments grüner Primärblätter erreicht. Das III. untersuchte etiolierte Blattstück wies nahezu die gleiche Einbaurate in die Fettsäuren auf wie das II. Segment; verglichen mit den grünen III. Blattsegmenten war dies nur etwa 1/5 der Einbaurate, die in den grünen Segmenten erreicht wurde (Abb. 13).
Die chlorotischen 70S ribosomenfreien Primärblätter zeigten in ihren jüngsten Abschnitten einen hohen Einbau von ^{14}C-Acetat in die gesamten Fettsäuren, der nur wenig unter der Einbaurate in die Fettsäure der 1. Segmente grüner Primärblätter lag. Im II. und III. Segment der 70S ribosomenfreien Primärblätter waren die Einbauraten deutlich geringer und erreichten jeweils nur etwa die Hälfte der Einbaurate des 1. Segmentes. Sie waren vergleichbar den Einbauraten, die in den II. und III. Segmenten der etiolierten Blätter gemessen wurden (Abb. 13).

Zwischen 27% und 75% des Gesamteinbaus von ^{14}C-Acetat in die Fettsäuren der jeweiligen Blattabschnitte waren in den sechs untersuchten polaren Lipiden (MGDG, DGDG, SQDG, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin) vorhanden (vergl. Tabelle 6, Abb. 15). Die restliche Radioaktivität, die in den verseifbaren lipophilen Substanzen gefunden wurde, ist in den Zwischenprodukten des Glycerolipidstoffwechsels (Phosphatidsäure und Diglyceride), anderen Phospholipiden (z.B. Phosphatidylinosit), in freien Fettsäuren und in den Fettsäuren epikutikularer Wachse zu suchen (Abb. 14).

Der Einbau von radioaktivem Acetat in die Fettsäuren der einzelnen untersuchten polaren Lipide zeigte entlang der Blattachse grüner Primärblätter, die bei permissiver Wachstumstemperatur (22°C) gewachsen waren,

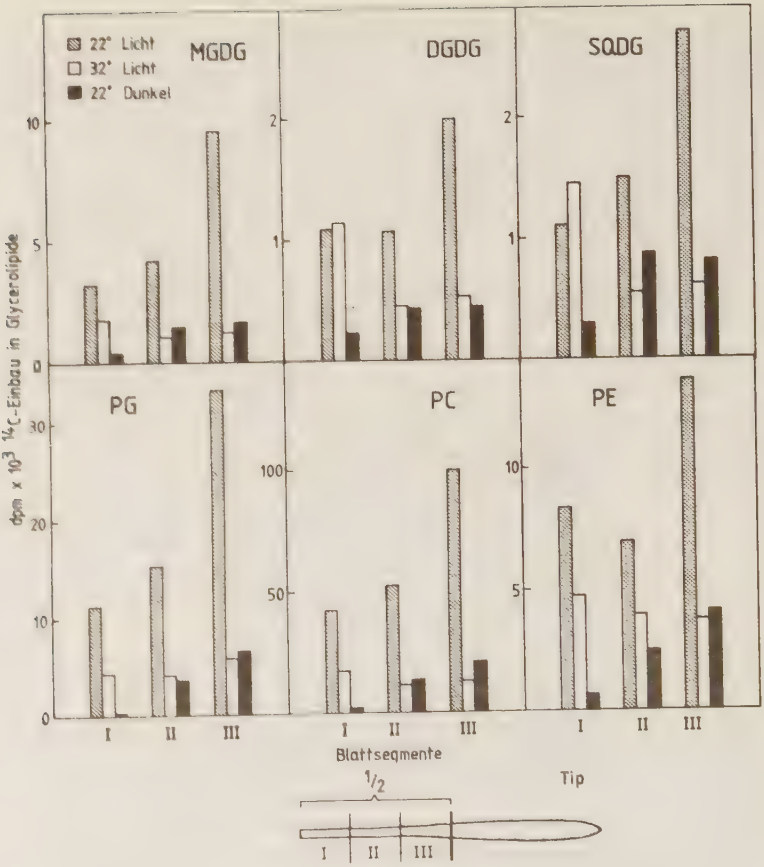


Abb. 15: Einbau von radioaktivem Acetat in Blattsegmente verschiedenen Entwicklungsalters (vergl. Abb. 5) der Primärblätter von Roggenpflanzen, die bei permissiven Bedingungen (22°C) im Licht oder im Dunkeln bzw. bei nicht-permissiven Bedingungen (32°C) im Licht gewachsen waren.

Angaben in dpm je Blattsegment

Abkürzungen: PG - Phosphatidylglycerin, PC -Phosphatidylcholin, PE - Phosphatidylethanolamin

das gleiche Verhalten, das für den Gesamteinbau in die Fettsäuren der drei Blattstücke beschrieben wurde; im I. und II. Segment wurden Einbauraten ähnlicher Größenordnung in die Fettsäuren der einzelnen untersuchten Glycerolipide nachgewiesen. Mit Ausnahme von DGDG und Phosphatidylethanolamin deutete sich in allen anderen untersuchten Glycerolipiden im II. Segment ein Ansteigen der Einbauraten an. Dieser Anstieg der Einbauraten des ^{14}C-Acetats in die Fettsäuren der Glycerolipide verstärkte sich im III. Segment. Die Einbauraten erreichten etwa das zwei- bis dreifache der Einbauraten in den jüngeren Segmenten (Abb. 15). Der Anstieg der Einbauraten betraf in diesen Blattstücken das DGDG und das Phosphatidylethanolamin im gleichen Maße wie die anderen Glycerolipide.

In den etiolierten Primärblättern, die bei 22°C gewachsen waren, zeigten die Einbauraten des Acetats in die Glycerolipide die gleiche Abhängigkeit vom Entwicklungsalter der Blattsegmente wie der Gesamteinbau in die Fettsäuren (Abb. 15, vergl. Abb. 13). Der Einbau von Radioaktivität war in allen drei untersuchten Glycolipiden im jüngsten Segment, verglichen mit dem Einbau in die I. Segmente grüner Blätter, sehr niedrig (17%). Im II. und III. Segment waren die Einbauraten in die Glycolipide vergleichbar, erreichten aber nur 41% bzw. 20% der Einbaurate in die Glycolipide der entsprechenden Segmente grüner Primärblätter (Tabelle 6, Abb. 15). Der Einbau des Acetats in die einzelnen Phospholipide der drei untersuchten Segmente etiolierter Primärblätter stieg, abweichend vom Gesamteinbau und dem Einbau in die Glycolipide, entlang der Blattachse kontinuierlich an (Abb. 15). Im I. etiolierten Blattstück wurden nur 5 % des Einbaus von Radioaktivität in das jüngste grüne Blattsegment gemessen, im II. bzw. III. etiolierten Segment wurden 27 % bzw. 22 % des Einbaus in die entsprechenden grünen Segmente erreicht (vergl. Tabelle 6).

In chlorotischen 70S ribosomenfreien Blättern wurde im jüngsten Segment in jedes der untersuchten Einzellipide bedeutend mehr radioaktives Acetat eingebaut, als in entsprechenden etiolierten Blattsegmenten. Einzig der Einbau ins DGDG und ins SQDG erreichten aber die Einbauraten, die in grünen Blattsegmenten (Segment I) gemessen wurden. Bei MGDG und den untersuchten Phospholipiden betrug die Einbaurate in den chlorotischen Segmenten zwischen 40 % und 57 % der Inkorporation in die entsprechenden Lipide der jüngsten grünen Blatteile (Abb. 15). Im Vergleich der beiden älteren chlorotischen Segmente (II und III) wiesen MGDG, DGDG, SQDG und die einzelnen Phospholipide Einbauraten gleicher Größenordnung auf. Die Einbauraten waren ähnlich denen, die in den entsprechenden Lipiden in den vergleichbaren Segmenten etiolierter Primärblätter gefunden wurden.

Entlang der Blattachse bilden sich also charakteristische Profile hinsichtlich der Lipidsynthese der Blätter in Abhängigkeit von der Plastidendifferenzierung aus. In grünen Blättern stieg der Einbau von Acetat entlang des Blattgradienten bis zur Mitte des Blattes an, in etiolierten Blättern wurde nach einem anfänglichen Anstieg ein konstantes Niveau erreicht. Dagegen kam es in den chlorotischen 70 S ribosomenfreien Blättern zunächst zu einer Verminderung des Acetateinbaus; in den älteren Segmenten bildete sich ein konstantes Niveau des Acetateinbaus aus.

Im Verlauf der Blattentwicklung stellten sich charakteristische Verhältnisse der Markierung von einzelnen Lipidgruppen in den verschiedenen Blattsegmenten ein. In grünen Blättern betrug das Verhältnis der Inkorporation von Radioaktivität in Phospholipiden zu der in Glycolipiden unabhängig vom Alter der Segmente etwa 11 : 1, das Verhältnis des Einbaus in die beiden Galactolipide (MGDG und DGDG) stieg entlang der Blattachse von

etwa 3 im jüngsten auf 4,8 im ältesten Segment an (Tabelle 6). In etiolierten Blättern erhöhten sich dagegen beide Verhältnisse von der Basis der Blätter zu den weiter distal gelegenen Segmenten: das Einbauverhältnis in Phospho- und Glycolipide stieg altersabhängig von 2,4 auf 10,9, das von MGDG zu DGDG von 1,7 auf 3,8 an (Tabelle 6).

Die Zunahme des Einbaus von Acetat in Fettsäuren und Glycerolipide entlang der Blattachse grüner Primärblätter steht im Einklang mit den Untersuchungen von Bolton und Harwood (1978), die diese an Blättern des Raygrases (Lolium perenne L.), der Gerste, des Weizen und des Mais durchgeführt hatten. Die relativen Einbauraten in die einzelnen Glycerolipide der vorliegenden Untersuchungen am Roggen weichen aber deutlich von den von Bolton und Harwood (1978) berichteten ab: In allen untersuchten Segmenten des Roggens wies Phosphatidylcholin die höchste Einbaurate auf, während von den Blättern der anderen Gräser berichtet wurde, daß Monogalactosyldiacylglycerid das Glycerolipid war, das die höchste Einbaurate aufwies. Die Diskrepanz der Ergebnisse ist möglicherweise eine Folge der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen. Während die Blattstücke der Roggenkeimlinge weitgehend intakt blieben, schnitten Bolton und Harwood (1978) die Blattsegmente in 0,5 mm breite Streifen. Dies vergrößerte einerseits die Oberfläche zur Aufnahme des ^{14}C-Acetat, zerstörte andererseits viele Zellen und löst als Wundreaktion möglicherweise sowohl eine gesteigerte Fettsäuresynthese u.a. für die Bildung von Cutin, Suberin und Wachsen als auch eine veränderte Glycerolipidzusammensetzung aus (Roughan und Slack, 1982; Koluttakudy, 1980). Die um 1/3 kürzere Inkubationszeit dürfte auf die Verteilung der aufgenommenen Radioaktivität von untergeordneter Bedeutung sein; die Inkorporation des Acetats ist während der ersten 2 - 3

Stunden der Inkubation linear (Hawke et al., 1974). Ein erhöhter Einbau von ^{14}C-Acetat bei weiterer Zerkleinerung des Blattmaterials und eine Veränderung des relativen Einbaus in MGDG und Phosphatidylglycerin ließ sich auch am Roggen nachweisen. Wurden die Blattsegmente vor der Inkubation noch einmal zerteilt, so daß Stücke von etwa 1 cm Länge entstanden, so verdoppelte sich die Einbauraten, es wurde mehr Radioaktivität in MGDG eingebaut und Phosphatidylcholin wurde schwächer markiert (vergl. Tabelle 6, III. Segment, und Tabelle 7, Spalte ohne 4,6-Dioxoheptansäure).

Die vergleichende Analyse der Primärblattsegmente des Roggens bei Wachstumsbedingungen, die die Ausbildung funktionstähiger, grüner Thylakoide gestatten (22°C im Licht) und bei Wachstumsbedingungen, die eine Bildung von Chlorophyll und von Chlorophyll-Protein-Komplexen nicht zulassen (22°C im Dunkeln bzw. 32°C im Licht) zeigte, daß die Einbauraten von ^{14}C-Acetat in die plastidenspezifischen Glycerolipide in den älteren Segmenten (II und III) grüner Primärblätter höher waren als die Einbauraten in den II. und III. Segmenten der Primärblätter, die kein Chlorophyll akkumulieren oder bilden können. Etiolierte und chlorotische Segmente (II und III) zeigten aber gleich hohe Einbauraten von Radioaktivität in die Glycerolipide. Für diesen Effekt, der bei der langfristigen Unterbindung der Chlorophyllsynthese und der Thylakoidbildung auftrat, können sowohl Veränderungen der Enzymmengen als auch die Beeinflussung vorhandener Enzymaktivitäten verantwortlich sein.

Um zu untersuchen, ob die Galactolipidsynthese nicht nur langfristig von der Synthese von Chlorophyllen in positiver (Wachstum bei 22°C im Licht) oder negativer Weise (Wachstum bei 22°C im Dunkeln oder bei 32°C im Licht) beeinflußt wird, sondern auch kurzfristig

Änderungen der Chlorophyllsynthese angepaßt wird, wurden die III. Segmente grüner Primärblätter, die die höchsten Einbauraten für ^{14}C-Acetat in die Fettsäuren und Glycerolipide gezeigt hatten (vergl. Tabelle 6), mit ^{14}C-Acetat und einem Hemmstoff der Chlorophyllsynthese inkubiert. Als Hemmstoff wurde 4,6 Dioxoheptansäure, ein Abbauprodukt des Tyrosins, eingesetzt. 4,6-Dioxoheptansäure hemmt die Aminolävulinsäure Dehydratase (Meller und Gassmann, 1980 und 1981). Die Effektivität der Hemmung durch 4,6-Dioxoheptansäure ist etwa 1.000fach stärker als die Hemmung des gleichen Enzyms durch Lävulinsäure, so daß mit sehr geringen Konzentrationen die Bildung von Porphobilinogen effektiv unterbunden werden kann (Meller und Gassman, 1981). Die Blattabschnitte wurden zunächst im Licht 40 min in 10mM Hemmstofflösung vorinkubiert, und während weiterer 180 min mit 10 μCi ^{14}C-Acetat in 10 mM 4,6-Dioxoheptanlösung im Licht inkubiert.

Wie aus Tabelle 7 zu ersehen ist, war die Einbaurate des radioaktiven Acetats in die verseifbaren lipophilen Stoffe der behandelten Blatteile gegenüber unbehandelten Kontrollen um 42% niedriger. Der Chlorophyllgehalt stieg während der Inkubationszeit von 220 min in den nicht behandelten Blatteilen um etwa 100 ng je Blatteil an; in den Segmenten, die mit dem Hemmstoff behandelt worden waren, sank der Chlorophyllgehalt um etwa 60 ng je Blatteil (Tabelle 7). Der Einbau von Radioaktivität in Chlorophyll ließ sich aus Dünnschichtchromatogrammen, wie sie Abb. 16 zeigt, nicht bestimmen, da sich im Bereich der Pigmente außer Chlorophyllen und Carotinoiden eine Vielzahl neutraler Lipide befinden (z.B. Diglyceride, Wachse, Sterole u.a.m.), die in diesem Trennsystem nicht aufgetrennt werden. Dennoch wird an diesem Versuch deutlich, daß mit einer Hemmung der Chlorophyllsynthese eine unmittelbare Hemmung der gesamten Glycerolipidesynthese und der Fettsäuresynthese einhergeht. Gleichzeitig mit der Verringerung der

	ohne 4,6-Di-oxoheptansäure		mit 4,6-Di-oxoheptansäure		% Hemmung
MGDG	25.000	(6,2)	10.700	(4,6)	57,2
DGDG	5.800	(1,5)	3.650	(1,6)	38,1
SQDG	6.830	(1,7)	4.210	(1,8)	38,3
PG	65.400	(16,1)	36.800	(15,8)	42,1
PC	217.900	(53,7)	124.700	(53,4)	42,8
PE	24.700	(6,1)	15.400	(6,6)	37,6
FFA	9.160	(2,3)	4.240	(1,8)	52,5
verseifbare lipophile Substanzen	406.100	(100)	233.400	(100)	42,5
MGDG / DGDG	4,23		2,93		
Phospholipide / Glycolipide	8,17		9,54		
Chlorophyllgehalt					
- vor der Inkubation	989 ± 56		989 ± 56		
- nach der Inkubation	1080 ± 38		927 ± 51		

Tabelle 7: Einbau von ^{14}C-Acetat in Fettsäuren und Glycerolipide grüner Blattsegmente bei gehemmter Chlorophyllsynthese. Die III. Segmente (vergl. Abb. 5) wurden mit 10 mM 4,6-Dioxoheptansäure, die 0,01 % (v/v) Tween 20 enthielt, 40 min vorinkubiert und weitere 180 min mit 10 μCi radioaktivem Acetat in 10mM 4,6-Dioxoheptansäure, die 0,01 % (v/v) Tween 20 enthielt, inkubiert. Angabe der Einbauraten in die Glycerolipide in dpm ^{14}C-Einbau je Blattsegment, in Klammern % der verseifbaren lipophilen Substanzen, Angabe des Chlorophyllgehaltes in ng Blattsegment

Abkürzungen: PG - Phosphatidylglycerin, PC -Phosphatidylcholin, PE - Phosphatidylethanolamin, FFA -freie Fettsäuren

Einbaurate in die gesamten Fettsäuren waren besonders stark die Einbauraten in die freien Fettsäuren und in das MGDG reduziert. Sie erreichten nur 47 % bzw. 43 % der Höhe der Einbauraten, die in Blattstücken ohne Hemmstoffbehandlung für die beiden Lipide gemessen wurden (Tabelle 7). Der Einbau in die Phospholipide Phosphatidylglycerin und Phosphatidylcholin wurde im

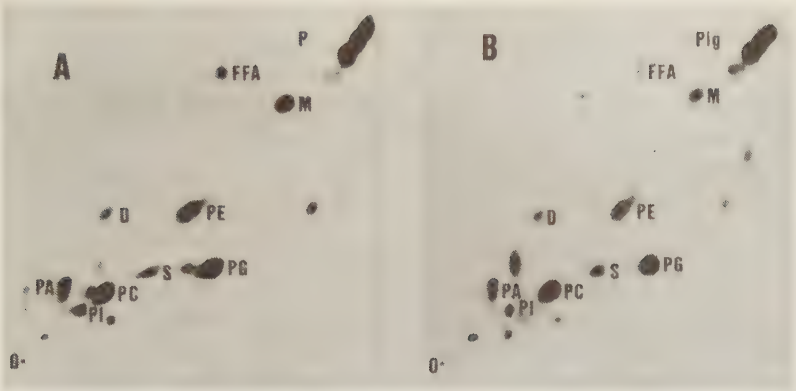


Abb. 16: Radioaktive Markierung von Glycerolipiden durch den Einbau von markiertem Acetat in den III. Segmenten (vergl. Abb. 5) von grünen Primärblättern des Roggens mit ungehemmter Chlorophyllsynthese (A) und durch 4,6-Dioxoheptansäure gehemmter Chlorophyllsynthese (B). Auftrennung der Extrakte durch Dünnschichtchromatographie. Die Segmente wurden 40 min in 10mM Dioxoheptansäure, die 0,01 % (v/v) Tween 20 enthielt vorinkubiert und weitere 180 min nach Zugabe von 10 μCi radioaktivem Acetat inkubiert.

Laufmittel: Chloroform-Methanol-Wasser 65:25:4 (senkrecht), Chloroform-Methanol-2-Aminopropan-7N Ammoniumhydroxid 65:35:0,5:5 (waagerecht) Nachweis durch Fluorographie

Abkürzungen: M - Monogalactosyldiacylglycerid, D -Digalactosyldiacylglycerid, S -Sulfochinovosyldiacylglycerid, PG - Phosphatidylglycerin, PC -Phosphatidylcholin, PE - Phosphatidylethanolamin, PI -Phosphatidylinosit, PA - Phosphatidsäure, FFA - freie Fettsäuren, Pig - Pigmente und neutrale Lipide, O -Start

gleichen Maße in den behandelten Blattstücken gehemmt wie der Gesamteinbau in die Fettsäuren; eine geringere Hemmung von etwa 38 % wiesen dagegen DGDG, SQDG und Phosphatidylethanolamin auf (Tabelle 7).

Nicht nur auf eine langfristige sondern auch auf eine kurfristige Beeinflussung der Chlorophyllsynthese können die Blätter des Roggens offensichtlich mit einer Anpassung der Fettsäure- und Glycerolipidsynthese reagieren.

3.2. Turnover der Fettsäuren von Glycerolipiden

Als eine weitere Möglichkeit zur Regulation der Galactolipidmengen in den chlorotischen 70S ribosomenfreien Primärblättern muß eine verminderte Stabilität durch Erhöhung des Turnovers dieser Lipide in Betracht gezogen werden. Es wurden daher Chase-Experimente unter den drei Wachstumsbedingungen (22°C im Licht oder im Dunkeln bzw. 32°C im Licht) durchgeführt. Als Blattmaterial wurde nur das II. Segment (vergl. Abb. 5) der Primärblätter verwendet, da sich bei etiolierten und 70S ribosomenfreien Primärblättern im Verlauf der weiteren Differenzierung (III. Segment) keine Änderungen der Einbauraten des Acetats ergeben hatten und damit die Änderungen im Inkubationsverhalten während des Chases nur gering sein dürften.
Nach einem dreistündigen Einbau von ^{14}C-Acetat wurden die Blätter weitere 24 Stunden mit nicht-radioaktivem Acetat, wie in Material und Methoden (5.1.) beschrieben, inkubiert. Das nicht-radioaktive Acetat der Inkubationslösung während des Chases stand zu dem radioaktiven Acetat, das in die Blattstücke aufgenommen worden war, in einem Verhältnis von etwa $2 \times 10^6 : 1$. Die Radioaktivität, die in den gesamten Fettsäuren (bestimmt als verseifbare, lipophile Substanzen) in grünen, etiolierten und 70S ribosomenfreien Blattstücken vorhanden war, nahm sofort nach Beginn des Chases ab, es erfolgte kein weiterer Einbau von radioaktiv markiertem Acetat (Tabelle 8). In grünen Segmenten war der Verlust von Radioaktivität im Verlauf

22°C Licht	0h	2h	4h	8h	12h	24h
verseifb. lipophil. Substanz.	90.840	88.690	83.590	78.050	79.410	77.620
Phospholipide	66.120	59.800	59.920	48.070	39.340	18.560
Glycolipide	7.420	9.580	9.850	9.400	6.610	4.450
MGDG / DGDG	4,09	2,66	2,62	2,04	1,77	1,11
Phospholipide / Glycolipide	8,91	6,24	6,08	5,11	5,95	4,17
22°C Dunkel						
verseifb. lipophil.Substanz.	55.600	58.560	44.340	43.220	39.520	26.020
Phospholipide	25.060	22.300	19.900	12.910	11.110	4.300
Glycolipide	2.510	3.240	2.420	1.960	2.530	1.070
MGDG / DGDG	3,85	2,81	2,22	1,80	1,63	2,09
Phospholipide / Glycolipide	9,98	6,88	8,22	6,59	4,39	4,02
32°C Licht						
verseifb. lipophil.Substanz.	116.400	67.100	n.b.	35.900	53.000	53.600
Phospholipide	30.510	20.480	15.570	13.160	13.840	5.740
Glycolipide	3.600	2.170	1.400	1.760	1.910	1.450
MGDG / DGDG	2,61	1,75	1,26	1,34	1,29	0,68
Phospholipide / Glycolipide	8,48	9,44	11,12	7,48	7,25	3,96

Tabelle 8: Turnover der Glycerolipide in den Segmenten von Primärblättern des Roggens, der bei 22°C im Licht oder im Dunkeln oder bei 32°C im Licht gewachsen war. Die Einbauzeit vor Beginn des Chases betrug 3 Stunden.

Angaben in dpm ^{14}C-Einbau je Blattsegment

Abkürzungen: verseifb. lipophil. Substanz. - Verseifbare lipophile Substanzen, n.b. - nicht bestimmt.

des Chases etwa nur 15 %; in den etiolierten und in den chlorotischen Blattstücken waren nach 24 Stunden nur noch etwa 47% der anfänglichen Markierung vorhanden (Tabelle 8).

Die Abnahme der Markierung in den untersuchten Glycerolipiden war in den Primärblattsegmenten aller drei Wachstumsbedingungen weit stärker. Sie erreichte in den grünen Blattstücken 69 %, in den etiolierten und 70S ribosomenfreien Segmenten 80 % (Tabelle 8). Vor allem die Fettsäuren der epikutikularen Wachse dürften für diesen Unterschied zwischen der Abnahme der radioaktiven Markierung in den gesamten Fettsäuren und der Markierung der Summe der Glycerolipide verantwortlich sein, da sie dem Stoffwechselgeschehen der Zelle weitgehend entzogen sind.

In den grünen Primärblattsegmenten, die bei 22°C gewachsen waren, nahm die Markierung in den Phospholipiden während der Inkubation mit nicht radioaktivem Acetat auf etwa 30% der Anfangsmarkierung ab. Die Glycolipide zeigten dagegen ein anderes Markierungsverhalten: in den ersten vier Stunden des Chases nahm die Markierung in den Glycolipiden zu und verringerte sich in der Folge (bis 24 Stunden nach Beginn des Chases) auf etwa 50 % der maximalen Markierung (Tabelle 8). Die Verschiebung der relativen Anteile an der Gesamtmarkierung werden in den gleichmäßig abnehmenden Werten des Quotienten aus der gemessenen Radioaktivität in den Phospholipiden und Glycolipiden deutlich (Tabelle 8). Verantwortlich für diese Verschiebung des Verhältnisses der Markierung ist die Substrat-Produkt-Folge im Verlauf der Galactolipidsynthese, wie sie von Roughan und Slack (1982) zusammenfassend beschrieben wurde: Ein Teil der Radioaktivität, die aus dem Phosphatidylcholin verloren geht, wird in MGDG über-

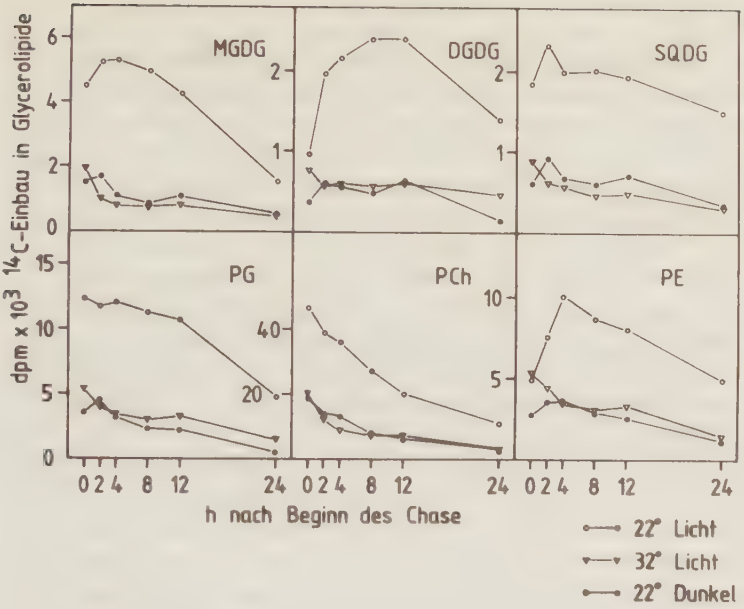


Abb. 17: Turnover der Glycerolipide in den II. Segmenten (vergl. Abb. 5) von Primärblättern, die bei permissiver Temperatur (22°C) im Licht oder im Dunkeln oder bei nicht-permissiver Temperatur (32°C) im Licht gewachsen waren. Die Einbauzeit für radioaktives Acetat vor Beginn des Chases betrug drei Stunden.

Angaben in dpm ^{14}C-Einbau je Blattsegment

Abkürzungen: PG - Phosphatidylglycerin, PC -Phosphatidylcholin, PE - Phosphatidylethanolamin

nommen. Während die Markierung im Phosphatidylcholin von Beginn des Chases an abnimmt, steigt sie im MGDG bis 4 Stunden nach Beginn des Chases an. Aus dem MGDG wird ein Teil der Radioaktivität in DGDG übertragen, in

dem die Markierung bis 12 Stunden nach Beginn des Chases ansteigt (Abb. 17). Ein Teil der Markierung des Phosphatidylcholins wird in Phosphatidylethanolamin übertragen, dessen Markierung in den ersten 4 Stunden der Inkubation mit nicht-radioaktivem Acetat auf das Doppelte der Anfangsmarkierung zunimmt. Die Übertragung von Fettsäuren aus dem Phosphatidylcholin über MGDG in DGDG und direkt in Phosphatidylethanolamin wurde auch von Roughan (1969, 1975) an Kürbisblättern beobachtet. Das gleichartige Verhalten etiolierter und chlorotischer 70S ribosomenfreier Blattsegmente hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der Veränderungen der eingebauten Radioaktivität in die gesamten Fettsäuren (Tabelle 8) bestätigte sich bei der Betrachtung der einzelnen Lipide. Die Änderungen der Radioaktivität während des Chases waren in den Blättern beider Wachstumsbedingungen nur geringfügig voneinander verschieden (Abb. 17); Unterschiede traten zumeist nur während der ersten 4 Stunden des Chases auf, hatten aber kaum Auswirkungen auf die Halbwertzeiten der einzelnen Glycerolipide.

Durch halblogarithmisches Auftragen der zeitabhängigen Veränderungen der radioaktiven Markierung in den einzelnen Lipiden wurden die Halbwertzeiten, die in Tabelle 9 aufgeführt sind, ermittelt. Die Halbwertzeiten der Phospholipide in den Segmenten von Primärblättern, die bei 22°C im Licht gewachsen waren, schwankten zwischen 10 und 12,5 Stunden.
MGDG hatte in diesen Blatteilen eine Halbwertzeit von 10,5 Stunden, während DGDG und SQDG längere Halbwertzeiten von 15,5 und 32 Stunden hatten. In den chlorotischen 70S ribosomenfreien Blättern waren die Halbwertzeiten von Phosphatidylcholin und -ethanolamin von ähnlicher Größenordnung wie in grünen Primärblättern, die Halbwertzeit von Phosphatidylglycerin war um 4 Stunden länger (Tabelle 9). Eine kürzere Halbwertzeit als in den grünen Segmenten wurde für das Sulfolipid

	22°C Licht	32°C Licht	22°C Dunkel
MGDG	10,5	18,0	15,5
DGDG	15,5	n.b.	8,5
SQDG	32,0	23,5	12,5
PG	10,5	14,0	7,5
PC	12,5	10,0	8,5
PE	10,0	12,5	11,5

Tabelle 9: Apparente Halbwertzeiten der Glycerolipide im II. Segment (vergl. Abb. 5) der Primärblätter von Roggenpflanzen, die bei permissiver Temperatur (22°C) im Licht oder im Dunkeln oder bei nicht-permissiver Temperatur (32°C) im Licht gewachsen waren. Für die Bestimmung der Halbwertzeiten wurden nur Werte nach Überschreiten dies maximalen Einbaus in das jeweilige Lipid (vergl. Abb. 18) verwendet; d.h. für MGDG ab 8 h, für DGDG ab 12 h, für SQDG ab 8 h, für PG ab 4 h, für PC ab 0 h und für PE ab 4 h nach Beginn des Chases.

Angaben in Stunden

Abkürzugen: PG - Phosphatidylglycerin, PC - Phosphatidylcholin, PE - Phosphatidylethanolamin

der chlorotischen Blattstücke bestimmt, während MGDG eine doppelt so lange Halbwertzeit aufwies wie in grünen Blättern (Tabelle 9). Die Abnahme des DGDG war während des Chases in den chlorotischen Blattabschnitten zu gering um eine Halbwertzeit angeben zu können; der Turnover dieses Lipids war aber auf jeden Fall langsamer als in den grünen Segmenten. In den etiolierten Blättern unterlagen die meisten Lipide einem stärkeren Turnover als in den grünen oder den 70S ribosomenfreien Blättern. Einzig Phosphatidylethanolamin und MGDG erreichten Halbwertzeiten, wie sie in chlorotischen oder grünen Blättern gemessen wurden (Tabelle 9). Besonders niedrig waren die Halbwertzeiten von DGDG und SQDG in den etiolierten Blättern, sie erreichten nur die Hälfte bzw. ein Drittel der Halb-

wertzeiten dieser Lipide in den grünen Blättern. Die hier angegebenen Halbwertzeiten der Lipide betreffen nur die Fettsäureanteile, die in diesen Glycerolipiden verestert sind. Für die Zuckeranteile der Galactolipide wurde von Ferrari und Benson (1961) gezeigt, daß sie sich im Markierungsverhalten deutlich von dem des Glyceringrundgerüstes und dem der Fettsäuren unterscheiden. Die Glycerolipide, die während des dreistündigen Pulses radioaktiv markiert wurden, zeigen in den chlorotischen 70S ribosomenfreien Blättern vorwiegend einen langsameren Turnover als die Glycerolipide in grünen Blättern. In den etiolierten Blättern ist der Glycerolipidumsatz dagegen leicht erhöht, die Stabilität des MGDG liegt aber in einer ähnlichen Größenordnung wie in den chlorotischen Blättern. Eine Regulation der Galactolipidmengen in den Blättern, die kein Chlorophyll ausbilden können, weil entweder die Proteinsynthese an 70S Ribosomen unterbunden ist oder der Einfluß des Lichtes nicht vorhanden ist, erfolgt also nicht durch eine Verstärkung des Umsatzes sondern durch Verminderung der Synthese der Lipide.

3.3. Fettsäure- und Glycerolipidsynthese in isolierten Plastiden

Da die Akkumulation der Galactolipide in den 70S ribosomenfreien Primärblättern nicht durch die Erhöhung ihres Turnovers sondern offensichtlich durch Beschränkung ihrer Synthese auf einen Bruchteil der Menge vermindert wird, die in grünen Primärblättern akkumuliert, wird im weiteren untersucht, welche Teilschritte der Galactolipidsynthese dieser Regulation unterliegen und damit die Gesamtsynthese limitieren. Hierzu wird die Kapazität der Fettsäuresynthese am in vitro Einbau von ^{14}C-Acetat und die Kapazität der Galactosylierung

der Diglyceride in Chloroplasten und 70S ribosomenfreien Plastiden mit Hilfe von UDP-^{14}C-Galactose bestimmt und verglichen.

Die Plastiden wurden aus den Primärblättern des Roggens, der bei permissiver (22°C) oder nicht-permissiver Temperatur (32°C) gewachsen war, isoliert und über Percollgradienten gereinigt (Höinghaus und Feierabend, 1983). Verunreinigungen durch außerplastidäre Zellbestandteile wurden durch Bestimmung der NAD-abhängigen Malat Dehydrogenase bestimmt. Sie betrug bei Chloroplasten etwa 4 %, bei 70S ribosomenfreien Plastiden etwa 6 %. Zur Bestimmung der Ausbeute intakter Plastiden wurde die Aktivität eines Leitenzyms der Plastiden, der NADP-abhängigen Glycerindehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, in den gereinigten Plastiden und in einem zellfreien Extrakt aus 1 g Blattmaterial gemessen. Die Ausbeute wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{I.} \quad \frac{Akt_{Pl} \times FG_{zE} \times 100}{Akt_{zE} \times FG_{Pl}} = \% \text{ Ausbeute}$$

wobei Akt_{Pl} die Gesamtaktivität des Enzyms in den gereinigten Plastiden, Akt_{zE} die Gesamtaktivität des Enzyms im zellfreien Extrakt, FG_{Pl} das Frischgewicht der Blätter, aus denen die Plastiden isoliert wurden und FG_{zE} das Frischgewicht der Blätter, die zur Herstellung des zellfreien Extraktes dienten, darstellen.
Um die Einbauraten der Plastidensuspensionen verschiedener Aufschlüsse miteinander vergleichen zu können, wurden die Einbauraten auf die Gesamtheit der Plastiden, die in 1 g Blattfrischgewicht enthalten waren, hochgerechnet. Dazu wurde folgende Formel benutzt:

$$\text{II.} \quad \frac{dpm^{14}C \times V_{PlSusp} \times 100}{V_{Pl} \times FG_{Pl} \times \% \text{ Ausbeute}} = dpm \times g\ FG^{-1}$$

V_{PlSusp} ist dabei das Gesamtvolumen der Plastidensuspension, V_{Pl} das eingesetzte Volumen der Plastidensuspension und FG_{Pl} das Frischgewicht der Blätter, aus denen die Plastiden isoliert worden waren.

Die 70S ribosomenfreien Plastiden haben, da sie chlorotisch sind, keine Möglichkeit, Licht zur Synthese von ATP und Reduktionsäquivalenten zu benutzen. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Einbauraten radioaktiven Acetats in die Fettsäuren von Chloroplasten und 70S ribosomenfreien Plastiden zu erreichen, wurden die Plastiden im Dunkeln inkubiert. Über das Inkubationsmedium mußten die Plastiden auch mit solchen Substraten und Co-Substraten versorgt werden, die Chloroplasten im Licht durch Photosynthese bereitstellen können. Es wurden ATP und Glycerin-3-Phosphat bei der Inkubation intakter Plastiden zugesetzt. ATP kann im Austausch gegen ADP durch einen Adenylat-Carrier in der Plastidenhüllmembran in das Plastidenstroma vermittelt werden (Heber und Heldt, 1981); für den Transport phosphorylierter Triosen steht, ebenfalls in der Plastidenhüllmembran, ein Phosphattranslokator zur Verfügung (Flügge, 1982). Da die Aktivität des Phosphattranslokators in den 70S ribosomenfreien Plastiden äußerst gering ist (Feierabend et al., 1984) und über die Leistung anderer Translokatoren in diesen Organellen keine Ergebnisse vorliegen, wurde der Einbau radioaktiven Acetats außer in intakten auch in osmotisch aufgebrochenen Plastiden analysiert. Als Cofaktoren der Fettsäuresynthese wurden den Inkubationsansätzen zusätzlich Coenzym A, Thiaminpyrophosphat und Hydro-

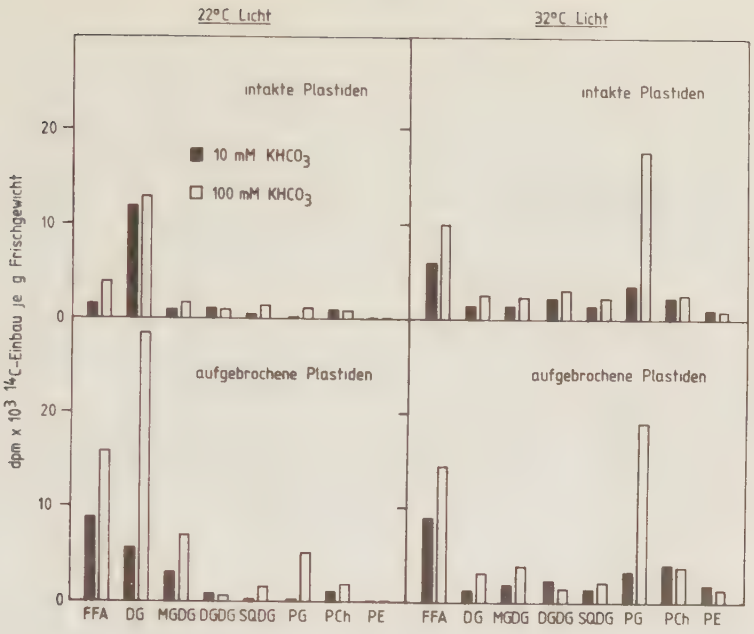


Abb. 18: In vitro Einbau von ^{14}C-Acetat in die Fettsäuren und Glycerolipide von isolierten Chloroplasten (22°C Licht) und isolierten 70S ribosomenfreien Plastiden (32°C Licht) aus Roggenkeimlingen.

Die Angaben wurden auf 100 % Plastidenausbeute anhand der Aktivität der NADP-abhängigen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase hochgerechnet.

Abkürzugen: FFA - freie Fettsäuren, DG - Diglyceride, PG - Phosphatidylglycerin, PC - Phosphatidylcholin, PE - Phosphatidylethanolamin

genkarbonat zugesetzt; in aufgebrochenen Plastiden wurde die Fettsäuresynthese zusätzlich mit NADH und NADPH unterstützt. Zur Aktivierung der Galactosyltransferasen wurden Mg^{2+} und Mn^{2+} zugefügt; das Cosubstrat UDP-Galactose der Galactosyltransferasen war ebenfalls im Inkubationsmedium enthalten.

	intakte Chloroplasten				aufgebrochene Chloroplasten			
	10 mM $KHCO_3$		100 mM $KHCO_3$		10 mM $KHCO_3$		100 mM $KHCO_3$	
MGDG	890	(5,4)	1.580	(6,9)	3.000	(14,9)	6.900	(11,2)
DGDG	1.000	(6,0)	830	(3,6)	751	(3,7)	700	(1,1)
SQDG	410	(2,5)	1.510	(6,6)	430	(2,1)	1.850	(3,0)
PG	190	(1,1)	1.260	(5,5)	270	(1,3)	5.340	(8,7)
PC	690	(4,2)	710	(3,1)	1.090	(5,4)	1.830	(3,0)
PE	200	(1,2)	180	(0,8)	227	(1,1)	240	(0,4)
FFA	1.520	(9,3)	3.930	(17,2)	8.880	(44,1)	16.370	(26,6)
DG	11.570	(70,3)	12.850	(56,2)	5.500	(27,3)	28.370	(46,1)
Summe	16.460	(100)	22.850	(100)	20.140	(100)	61.600	(100)
verseifbare lipophile Substanzen	4.300		24.070		16.720		70.490	

Tabelle 10: Einbau von ^{14}C-Acetat in Fettsäuren und Glycerolipide von isolierten Chloroplasten aus den Primärblättern des Roggens. Die Plastiden wurden im Dunkeln bei 25°C 30 min inkubiert.

Die Angaben sind in dpm ^{14}C-Einbau je g Frischgewicht des Blattmaterials, aus dem die Plastiden isoliert wurden, gemacht; die Werte wurden mittels der Aktivität der NADP-abhängigen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase auf die Gesamtmenge der Plastiden, die in 1g Blattfrischgewicht enthalten sind, hochgerechnet. Die Werte in Klammern geben % des Gesamteinbaus in Glycerolipide plus freie Fettsäuren an.

Abkürzungen: PG - Phosphatidylglycerin, PC - Phosphatidylcholin, PE - Phosphatidylethanolamin, FFA - freie Fettsäuren, DG - Diglyceride

	intakte 70S ribosomenfreie Plastiden				aufgebrochene 70S ribosomenfreie Plastiden			
	10 mM $KHCO_3$		100 mM $KHCO_3$		10 mM $KHCO_3$		100 mM $KHCO_3$	
MGDG	1.390	(7,2)	2.430	(5,9)	1.910	(7,2)	3.790	(7,7)
DGDG	2.160	(11,2)	3.060	(7,4)	2.420	(9,8)	1.450	(2,9)
SQDG	1.330	(6,9)	2.210	(5,3)	1.390	(5,6)	2.110	(4,3)
PG	3.610	(18,7)	17.790	(42,8)	3.240	(13,1)	19.260	(39,1)
PC	2.350	(12,2)	2.580	(6,2)	3.840	(15,5)	3.600	(7,3)
PE	1.100	(5,7)	900	(2,2)	1.870	(7,6)	1.320	(2,7)
FFA	5.870	(30,4)	10.020	(24,1)	8.990	(36,4)	14.510	(29,4)
DG	1.490	(7,7)	2.540	(6,1)	1.060	(4,3)	3.260	(6,6)
Summe	19.310	(100)	41.520	(100)	24.720	(100)	49.300	(100)
verseifbare lipophile Substanzen	21.560		55.040		22.250		56.780	

Tabelle 11: Einbau von ^{14}C-Acetat in Fettsäuren und Glycerolipide von isolierten 70S ribosomenfreien Plastiden aus den Primärblättern des Roggens. Die wurden im Dunkeln bei 25°C 30 min inkubiert.

Die Angaben sind in dpm ^{14}C-Einbau je g Frischgewicht des Blattmaterials, aus dem die Plastiden isoliert wurden, gemacht; die Werte wurden mittels der Aktivität der NADP-abhängigen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase auf die Gesamtmenge der Plastiden, die in 1 g Blattfrischgewicht enthalten sind, hochgerechnet. Die Werte in Klammern geben % des Gesamteinbaus in Glycerolipide plus freie Fettsäuren an.

Abkürzungen: PG - Phosphatidylglycerin, PC - Phosphatidylcholin, PE - Phosphatidylethanolamin, FFA - freie Fettsäuren, DG - Diglyceride

Vorversuche zeigten, daß die Einbaurate des ^{14}C-Acetats in die Glycerolipide der Plastiden sich durch eine Erhöhung der $KHCO_3$-Konzentration von 10 mM, wie sie von vielen Autoren verwendet wird, auf 100 mM auf mindestens das Doppelte steigern ließ. Die Verteilung der Radioaktivität auf die untersuchten Lipide änderte sich hierbei ebenfalls (Abb. 18, 19). Insbesondere traten Verschiebungen des radioaktiven Einbaus in zwei bisher nicht identifizierte Substanzen (Abb. 19, X_1 und X_2) und in Phosphatidylglycerin auf. Die Muster der Lipide, die in intakten und aufgebrochenen Plastiden radioaktiv markiert wurden, unterschieden sich nur quantitativ; in osmotisch aufgebrochenen Plastiden wurden zwei- bis dreifach höhere Einbauraten gefunden (Tabellen 10 und 11, Abb. 18).

Intakte Chloroplasten inkorporierten radioaktiv markiertes Acetat vorwiegend in freie Fettsäuren und Diglyceride. Geringerer Einbau wurde auch in den Phospho- und Glycolipiden gefunden (Abb. 18, Tabelle 10). Die Erhöhung der Hydrogenkarbonatkonzentration auf 100 mM förderte den Einbau von Radioaktivität in Phosphatidylglycerin, das Sulfolipid, MGDG und freie Fettsäuren um mehr als 50 %. Die relative Verteilung der Radioaktivität zeigte dies in einer Verringerung des Anteils der Diglyceride am Gesamteinbau von ^{14}C-Acetat um 14 % (Tabelle 10).

In osmotisch aufgebrochenen Chloroplasten wurde bei einer Konzentration von 10 mM $KHCO_3$ im Inkubationsmedium radioaktives Acetat besser in die freien Fettsäuren, MGDG und Phosphatidylcholin eingebaut als in den intakten Organellen, die bei der gleichen $KHCO_3$-Konzentration inkubiert wurden. Die Aufhebung der Permeabilitätsbarrieren durch Aufbrechen der Plastidenhüllmembran hatte offensichtlich eine bessere Versor-

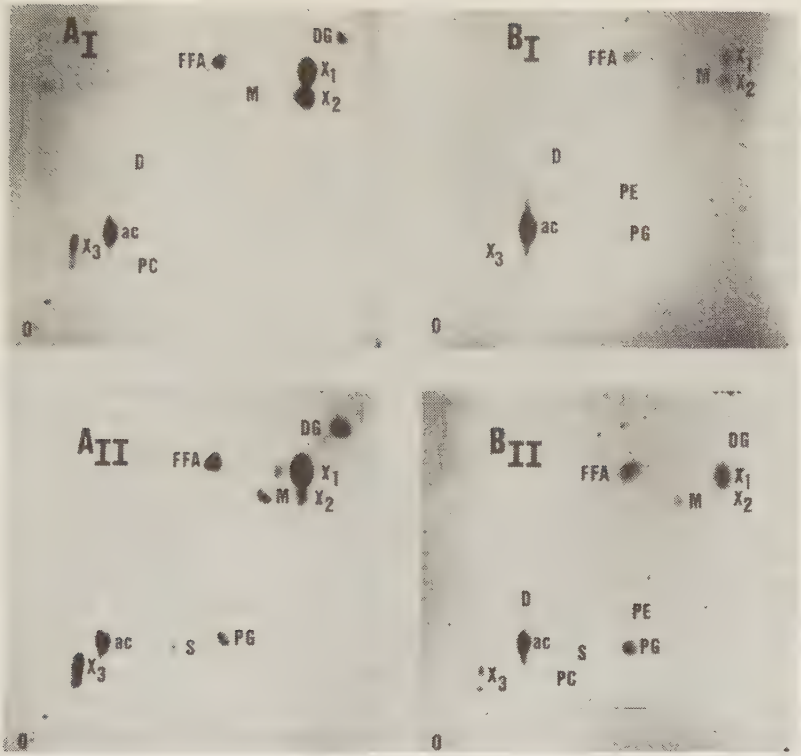


Abb. 19: In vitro Einbau von ^{14}C-Acetat in die polaren Lipide von isolierten Chloroplasten (A) und isolierten 70S ribosomenfreien Plastiden (B) des Roggens bei verschiedenen Konzentrationen von $KHCO_3$ (I. 10 mM, II. 100 mM) im Inkubationsmedium. Auftrennung durch Dünnschichtchromatographie.

Laufmittel: Chloroform-Methanol-Wasser 65:25:4 (senkrecht), Chloroform-Methanol-2-Aminopropan-7N Ammoniumhydroxid 65:35:0,5:5 (waagerecht).

Nachweis durch Fluorographie

Abkürzungen: M - Monogalactosyldiacylglycerid, D - Digalactosyldiacylglycerid, S - Sulfochinonvosyldiacylglycerid, PG - Phosphatidylglycerin, PC - Phosphatidylcholin, PE - Phosphatidylethanolamin, ac - Acetat, DG - Diglyceride, FFA - freie Fettsäuren, X_1 - X_3 - unbekannt

gung der Enzyme der Fettsäuresynthese und der Galactolipidbildung mit Substraten und Co-Substraten zur Folge. Durch die Erhöhung der Konzentration des $KHCO_3$ wurde die Synthese von Fettsäuren und Glycerolipiden in den aufgebrochenen Chloroplasten weit drastischer gesteigert als in den intakten Organellen (Abb. 18, Tabelle 10). Es wurde in die freien Fettsäuren und in die Fettsäuren der Glycerolipide insgesamt dreimal so viel Radioaktivität inkorporiert als bei der niedrigen $KHCO_3$-Konzentration. Die Steigerungsraten waren bei den Diglyceriden, dem Phosphatidylglycerin und dem MGDG am höchsten; MGDG war das polare Lipid, das am stärksten radioaktiv markiert wurde.

Die Einbauraten, die in den gesamten Fettsäuren, den Diglyceriden und den freien Fettsäuren der intakten Chloroplasten bei der Inkubation im Dunkeln gemessen wurden, waren den Einbauraten vergleichbar, die McKee und Hawke (1979) in intakten Spinatchloroplasten bestimmt hatten, die während der Inkubation belichtet worden waren. McKee und Hawke (1979) bestimmten folgende Einbauraten pro mg Chlorophyll: in den gesamten Fettsäuren 1,85 x 10^6 dpm ^{14}C-Einbau, in den Diglyceriden 1,16 x 10^6 dpm ^{14}C-Einbau und in den freien Fettsäuren 0,35 x 10^6 dpm ^{14}C-Einbau; die entsprechenden Werte für die Chloroplasten des Roggens, der im Dunkeln inkubiert worden war, betragen 1,65 -2,29 x 10^6 dpm ^{14}C-Einbau für die gesamten Fettsäuren, 1,16-1,29 x 10^6 dpm ^{14}C-Einbau für die Diglyceride und 0,15-0,39 x 10^6 dpm ^{14}C-Einbau für die freien Fettsäuren, da in den Inkubationsansätzen etwa 10 μg Chlorophyll enthalten waren. Daraus folgt, daß in den Inkubationsansätzen im Dunkeln die Fettsäuresynthese die gleiche Größenordnung erreichte, die sonst auch im Licht bei Chloroplasten anderer Pflanzen beobachtet wurde.

Die Gesamteinbauraten von ^{14}C-Acetat in die Fettsäuren der 70S ribosomenfreien Plastiden waren in intakten und

aufgebrochenen Plastiden sowohl qualitativ als auch quantitativ äußerst ähnlich. Es ergab sich also im Gegensatz zur Fettsäuresynthese in Chloroplasten hier keine Steigerung durch Aufbrechen der Plastidenhüllmembran (Tabelle 11, Abb. 18).
In den 70S ribosomenfreien Plastiden, die mit der niedrigen Hydrogenkarbonatkonzentration von 10 mM inkubiert worden waren, enthielten DGDG, Phosphatidylglycerin und Phosphatidylcholin jeweils mehr Radioaktivität als das MGDG; in 70S ribosomenfreien Plastiden wurden unter diesen Bedingungen die Fettsäuren am stärksten markiert und nur wenig Markierung war in den Diglyceriden enthalten. Die Erhöhung der Hydrogenkarbonatkonzentration in den Inkubationsansätzen auf 100 mM führte sowohl bei intakten als auch bei osmotisch aufgebrochenen 70S ribosomenfreien Plastiden zu einem stärkeren Gesamteinbau des ^{14}C-Acetats in Fettsäuren. Der größte Anteil des inkorporierten Acetats wurde in das Phosphatidylglycerin eingebaut, das in aufgebrochenen und intakten Plastiden 40% der Radioaktivität enthielt, die in den gesamten Fettsäuren gefunden wurde. Daneben wurden freie Fettsäuren stark markiert. Die Einbauraten in die anderen untersuchten Glycerolipide waren niedrig. Sie waren nur in den Diglyceriden und im MGDG deutlich höher als bei der niedrigen $KHCO_3$-Konzentration; DGDG und SQDG waren nur wenig stärker markiert, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin zeigten bei beiden $KHCO_3$-Konzentrationen nahezu gleich hohe Einbauraten (Tabelle 11, Abb. 18).

Der Gesamteinbau radioaktiven Acetats in Fettsäuren der Chloroplasten und der 70S ribosomenfreien Plastiden ist in intakten Plastiden, die bei niedriger Hydrogenkarbonatkonzentration inkubiert wurden, annähernd gleich hoch. Bei erhöhter Hydrogenkarbonatkonzentration wird in intakten chlorotischen Plastiden 80 % mehr Radioaktivität in die Fettsäuren eingebaut als in intakten

Chloroplasten. Aufgebrochene chlorotische 70S ribosomenfreie Plastiden inkorporieren bei niedriger Hydrogenkarbonatkonzentration etwa 20 % mehr, bei erhöhter Hydrogenkarbonatkonzentration dagegen 20 % weniger Radioaktivität als aufgebrochene Chloroplasten. Die Bildung und Akkumulation der Galactolipide in den 70S ribosomenfreien Plastiden scheint daher nicht durch die Fettsäurebiosynthese limitiert zu werden. Es zeigt sich jedoch deutlich, daß die Chloroplasten im Dunkeln nicht ausreichend mit Substraten und Co-Substraten der Fettsäuresynthese versorgt werden, während die intakten chlorotischen 70S ribosomenfreien Plastiden offenbar in der Lage sind, diese in ausreichendem Maße aus dem Medium aufzunehmen. Dies ist möglicherweise in unterschiedlichen Permeabilitätseigenschaften der Hüllmembranen der beiden Organellentypen begründet. Die Aktivitäten der Transportsysteme, die für die meisten Substrate und Co-Substrate benötigt werden, könnte in den chlorotischen Plastiden größer sein als in den Chloroplasten, da sie ständig von der Unterstützung des Cytoplasmas abhängig sind, während die Chloroplasten eine größere Unabhängigkeit erlangen, und nur in der Dunkelheit z.B. auf den Import von Energie und Reduktionsäquivalenten angewiesen sind. Unterschiedliche Aktivitäten für Transportsysteme in Abhängigkeit vom Differenzierungszustand der Plastiden wurden z.B. für den Adenylat-Carrier durch Robinson und Wiskich (1977) nachgewiesen: in jungen Blättern der Erbse ist die Kapazität des ATP-Transportes über die Hüllmembran größer als in ausdifferenzierten, älteren Blättern. Die gleichhohe Inkorporation des Acetats in die Fettsäuren der Glycerolipide intakter und aufgebrochener 70S ribosomenfreier Plastiden widerspricht allerdings den Ergebnissen von Höinghaus (1984), der in den 70S ribosomenfreien Plastiden eine nur sehr geringe Aktivität des Phosphattranslokators nachweisen konnte. Das zur Bildung von Lysophosphatidsäure im Plastiden-

stroma aber Glycerin-3-Phosphat benötigt wird und dieses die Hüllmembran nicht frei passieren kann, muß es im vorliegenden Fall in ausreichendem Maße durch den Phosphattranslokator in die Plastiden aufgenommen worden sein.

Wie aus Abb. 18 zu entnehmen ist, waren Diglyceride in intakten Chloroplasten dasjenige Produkt, das den größten Anteil der radioaktiven Markierung enthielt. In aufgebrochenen Chloroplasten wurden Diglyceride bei der niedrigen $KHCO_3$-Konzentration deutlich markiert, während sie bei der erhöhten $KHCO_3$-Konzentration das Lipid darstellten, das am stärksten markiert wurde. In den 70S ribosomenfreien Plastiden wurde dagegen in den Diglyceriden sowohl nach der Inkubation intakter als auch aufgebrochener Plastiden mit ^{14}C-Acetat bei hoher oder niedriger HCO_3-Konzentration nur eine vergleichbar geringe Menge Radioaktivität nachgewiesen. Deutlich stärker markiert war hier dagegen Phosphatidylglycerin, das in Chloroplasten - mit Ausnahme aufgebrochener Chloroplasten, die bei 100 mM $KHCO_3$ inkubiert worden waren - eine sehr geringe Markierung aufwies. In den 70S ribosomenfreien Plastiden war die Inkorporation des Acetats bei der erhöhten KHCO-Konzentration sehr deutlich gesteigert. Die regulatorischen Vorgänge, die zu dem deutlich unterschiedlichen Einbauverhalten von Chloroplasten und 70S ribosomenfreien Plastiden und der Veränderung der Einbauraten in die Diglyceride bzw. das Phosphatidylglycerin bei erhöhter $KHCO_3$-Konzentration führen, sind bisher noch ungeklärt.

3.4. Synthese von Galactolipiden in isolierten Plastiden mit UDP-^{14}C-Galactose als Substrat

Die niedrigen Markierungsraten der beiden Galactolipide nach der Inkubation mit ^{14}C-Acetat in vitro sind nicht unerwartet, da Roggen zu den $C_{18:3}$-Pflanzen gehört und daher in seinen Plastiden Linolensäure nicht gebildet werden kann. Andere Fettsäuren sind aber nur in geringerem Maße mit den Galactolipiden verestert. Eine Untersuchung der Kapazität der Galactolipidbildung in den Plastiden des Roggens kann daher nicht von der Seite der Fettsäuren her erfolgen. Sie muß vor allen Dingen den letzten Schritt ihrer Synthese, die Galactosylierung der Diglyceride berücksichtigen. Während die Fettsäurereste der Galactolipide einen langsamen Einbau photosynthetisch fixierten radioaktiven Kohlenstoffs zeigen, werden die polaren Gruppen der Galactolipide sehr rasch mit radioaktiv markiertem Material besetzt (Benson et al., 1958; Kates, 1960) und zeigen einen Turnover, der sich von dem der Fettsäureanteile dieser Lipide deutlich unterscheidet (Benson et al., 1958; Ferrari und Benson, 1961). MGDG ist bei den Markierungsversuchen mit $^{14}CO_2$ in photosynthetisch aktiven Chlorellen das erste auftretende Markierungsprodukt. Es ist bereits nach 15 s nachweisbar (Ferrari und Benson, 1961). Bei einem nachfolgenden Chase nimmt seine Markierung ab, während gleichzeitig ein entsprechender Anstieg der Radioaktivität im DGDG gefunden wird. Ferrari und Benson (1961) schlossen aus diesen in vivo Markierungen auf eine schrittweise Galactosylierung von Diglyceriden mit UDP-Galactose als Co-Substrat. Der Einbau der UDP-Galactose erfolgt durch Galactosyltransferasen, die in der Hüllmembran der Plastiden lokalisiert sind (Joyard und Douce, 1976a). In den Chloroplasten und den 70S ribosomenfreien Plastiden wurde daher der Einbau von UDP-^{14}C-Galactose untersucht und verglichen.

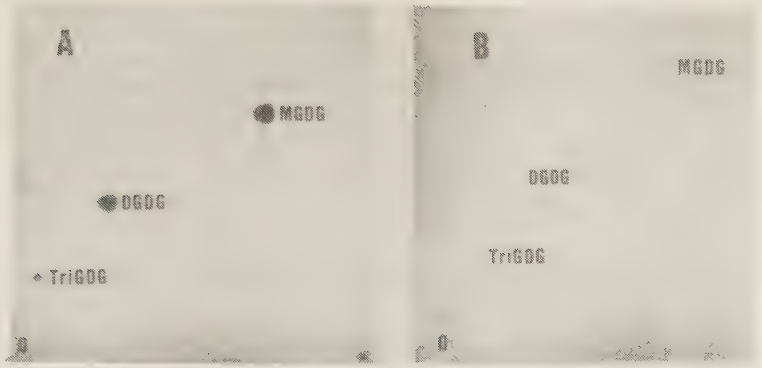


Abb. 20: In vitro Einbau von UDP-^{14}C-Galactose in die Galactolipide von isolierten Chloroplasten (A) und isolierten 70S ribosomenfreien Plastiden (B) aus den Primärblättern von Roggenkeimlingen.

Laufmittel: Chloroform-Methanol-Wasser 65:25:4 (senkrecht), Chloroform-Methanol-2-Aminopropan-7N Ammoniumhydroxid 65:35:0,5:5 (waagerecht)

Nachweis durch Fluorographie

Die Chromatogramme von Lipidextrakten aus isolierten Chloroplasten zeigten nach der Inkubation mit radioaktiver UDP-Galactose einen deutlichen Einbau in MGDG, DGDG und TriGDG (Abb. 20 A). Letzteres ist in vivo nicht oder nur in Spuren nachweisbar (Douce und Joyard, 1980). Der Vergleich der Fluorogramme von chromatographischen Auftrennungen der Extrakte aus Chloroplasten bzw. 70S ribosomenfreien Plastiden die mit UDP-^{14}C-Galactose inkubiert worden waren, (Abb. 20 A und B) zeigte, daß die 70S ribosomenfreien Plastiden bedeutend weniger Radioaktivität in die Galactolipide inkorporierten als Chloroplasten. Intakte Chloroplasten bauten etwa 10 Mal mehr Radioaktivität in die Galactolipide ein als intakte chlorotische Plastiden, wie die Bestimmung der Radioaktivität in den einzelnen Lipiden

	22°C Dauerlicht		32°C Dauerlicht	
	intakt	aufgebrochen	intakt	aufgebrochen
MGDG	17.700	49.200	1.750	4.670
DGDG	13.200	26.000	1.480	2.200
TriGDG	1.130	1.660	450	140

Tabelle 12: Einbau von radioaktiv markierter Galactose in die Galactolipide von Chloroplasten (22°C Dauerlicht) und 70S ribosomenfreien Plastiden (32°C Dauerlicht), die aus den Primärblättern des Roggens isoliert wurden.

Angaben in dpm/gFrischgewicht; die Werte wurden durch die Bestimmung der NADP-abhängigen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase Aktivität auf die Gesamtmenge der Plastiden, die in 1g Blattfrischgewicht enthalten sind, hochgerechnet.

durch Szintillationsmessung ergab (Tabelle 12). Um auszuschließen, daß diese Unterschiede durch Permeabilitätsunterschiede der Hüllmembranen der beiden Plastidentypen hervorgerufen wurden, wurden die Plastiden osmotisch aufgebrochen und mit UDP-^{14}C-Galactose inkubiert. Die Einbauraten stiegen sowohl in den Chloroplasten wie in den 70S ribosomenfreien Plastiden auf nahezu das dreifache der Einbauraten intakter Plastiden an. Die Verteilung der Radioaktivität auf die verschiedenen Galactolipide war in Chloroplasten und 70S ribosomenfreien Plastiden (aufgebrochenen wie intakten) annähernd gleich. Die Markierung des MGDG machte zwischen 50 und 65 % der Gesamtmarkierung aus, DGDG erreichte 30 bis 40 % und TriGDG 2 - 12 % der Gesamtmarkierung (Tabelle 12).

Die Synthese der Galactolipide scheint in den chlorotischen 70S ribosomenfreien Plastiden durch die Verminderung der Aktivität der Galactosyltransferasen limitiert zu werden.

IV. DISKUSSION

Während der Differenzierung der Plastiden in den Blättern von Pflanzen kommt es zu einer starken Vermehrung von Membranen im Inneren dieser Organellen. Die Zusammensetzung der Membranen ausdifferenzierter Chloroplasten ist qualitativ recht gut untersucht. Quantitative Ergebnisse wurden zuerst von Lichtenthaler und Park (1963) zugesammengefaßt. Die Synthesewege der einzelnen Komponenten der Lipidfraktionen dieser Membranen sind in großen Zügen bekannt (Heinz, 1977; Goodwin, 1977; Douce und Joyard, 1980; Roughan und Slack, 1982). Teilschritte der Synthesen sind z.T. bereits gut untersucht und die Lokalisierung einer Vielzahl von Enzymen ist bekannt (Roughan und Slack, 1982; Soll et al., 1980a und 1980b). Jedoch werden nicht alle in den Chloroplasten lokalisierten Enzyme auch innerhalb der Organellen synthetisiert. Es wurde nachgewiesen, daß alle an der Synthese von Carotinoiden und die Mehrzahl der an der Synthese von Chlorophyllen beteiligten Enzyme an cytoplasmatischen 80S Ribosomen translatiert werden (Rademacher und Feierabend, 1976; Feierabend, 1977). Ungeklärt ist bei der Synthese des Chlorophylls, ob die Enzyme für die Bildung der δ-Aminolävulinsäure und das Enzym, das die Phythylierung des (Proto-)Chlorophyllids durchführt, ebenfalls an 80S Ribosomen gebildet werden. Von Lichtenthaler (1977) liegen Hinweise vor, daß sowohl plastidäre als auch cytoplasmatische Proteinsynthese zur Bildung der Enzyme beitragen, die für die Synthese der Prenylchinone verantwortlich sind. Die Syntheseorte von Enzymen der Galactolipidsynthese und der Fettsäuresynthese waren dagegen bei Aufnahme der Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit noch unbekannt. Auch die Lokalisierung der Enzymbildung für die Synthese der Saponine, die zu der Zeit, als die Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit aufgenommen wurden, als

strukturbestimmender Bestandteil der Prolamellarkörper von Etioplasten angesehen wurden (Kesselmeier und Ruppel, 1979; Kesselmeier und Budzikiewicz, 1979), ist bisher nicht bekannt. Mit Hilfe 70S ribosomenfreier Roggen- und Haferblätter sollten die Translationsorte der Enzyme der diversen Lipidsynthesen eindeutig bestimmt werden.

Protochlorophyll(id) und Saponine waren in etiolierten 70S ribosomenfreien Blättern eindeutig nachweisbar, Saponine allerdings nur in Haferblättern. Die Menge des Protochlorophyllids war in den basalen, völlig 70S ribosomenfreien Blatteilen auf 40% der Menge vermindert, die in etiolierten Kontrollen permissiver Wachstumstemperatur nachweisbar waren. Da in den 70S ribosomenfreien Etioplasten keine Prothylakoide gebildet werden, muß das Protochlorophyll(id) in diesen Blättern mit den Membrankomplexen der Prolamellarkörper assoziiert sein. Während Lütz und Klein (1979) das Vorkommen von Protochlorophyll(id) in den Prolamellarkörpern in Frage stellten, konnten Ryberg und Sundqvist (1982) ebenfalls 40% des Gesamtgehaltes von Protochlorophyll(id) der Etioplasten in den Prolamellarkörpern nachweisen; 60 % waren in den Prothylakoiden lokalisiert. In den Blättern, die bei der erhöhten Temperatur gewachsen waren, scheint eine weitere Synthese von Protochlorophyll(id) an die Bildung von Prothylakoiden gebunden zu sein, wie auch die höheren Gehalte des Pigments in den Blattspitzen dieser Blätter zeigen. In diesen könnte aufgrund der Anwesenheit geringer Ribosomenmengen in den Plastiden die Bildung von Prothylakoiden möglich sein. Die Protochlorophyll(id)gehalte, die in den 70S ribosomenfreien etiolierten Blättern bestimmt wurden, sind weit geringer als die Mengen, die in chlorotischen 70S ribosomenfreien Blättern, die im Licht gewachsen waren und 24 Stunden mit nicht-radioaktiver δ-Aminolävulin-

säure im Dunkeln inkubiert worden waren (vergl. Feierabend, 1977). Ohne die externe Zugabe von δ-Aminolävulinsäure wurde von chlorotischen 70S ribosomenfreien Blättern im Dunkeln ähnlich viel Protochlorophyll(id) gebildet, wie in etiolierten 70S ribosomenfreien Blättern (vergl. Feierabend, 1977). Das Enzymsystem, das δ-Aminolävulinsäure synthetisiert, ist also auch in den chlorotischen 70S ribosomenfreien Blättern im Dunkeln limitierend für die Protochlorophyll(id)-bildung. Ob durch die Zugabe von δ-Aminolävulinsäure zu etiolierten 70S ribosomenfreien Blättern eine gesteigerte Synthese des Pigments ermöglicht wird, wurde nicht untersucht. Alle Enzyme der Protochlorophyll(id)synthese werden nach den vorliegenden Ergebnissen ausschließlich an 80S Ribosomen translatiert. Auch der erste Schritt der Chlorophyllsynthese, die Bildung von δ-Aminolävulinsäure, wird also von Enzymen durchgeführt, die cytoplasmatischen Ursprungs sind.

Zu Beginn der Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden von Kesselmeier und Mitarbeitern (Kesselmeier und Ruppel, 1979; und Kesselmeier und Budzikiewicz, 1979) zwei Steroidsaponine als strukturbestimmende Substanzen der Prolamellarkörper von Etioplasten des Hafers beschrieben. Kosmac (1980) war nicht in der Lage, diese Saponine auch in Roggenetioplasten nachzuweisen, was ihre allgemeine Bedeutung für die Struktur der Prolamellarkörper in Frage stellte. In 70S ribosomenfreien Haferblättern werden die Saponine sowohl im Licht wie im Dunkeln gebildet. Die Enzyme ihrer Synthese werden also an cytoplasmatischen Ribosomen translatiert. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Kesselmeier und Ruppel (1979), die eine rasche Abnahme der Saponine in isolierten Chloro-Etioplasten von belichteten Haferblättern beschrieben, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß die Saponingehalte der Blätter bei Belichtung sowohl bei permissiver

als auch bei nicht-permissiver Temperatur anstiegen. Das Vorkommen der Saponine ist also nicht alleine auf ein Wachstum im Dunkeln beschränkt und nicht mit der Ausbildung von Prolamellarkörpern korreliert. Weiterführende Untersuchungen von Kesselmeier (1982) haben inzwischen ergeben, daß die Saponine sich während der Isolierung der Plastiden an die Prolamellarkörper anheften und ihre Assoziation mit den Prolamellarkörpern ein nur in vitro auftretendes Isolierungsartefakt darstellt. Weiterhin gelang es Kesselmeier und Urban (1983) durch Untersuchungen von Protoplasten des Hafers zu zeigen, daß die 26-Desglucoavenacoside, die sich an die Prolamellarkörper anheften, aus Avenacosiden, die in der Vakuole der Zellen lokalisiert sind, durch eine β-Glucosidase (wahrscheinlich im Tonoplasten lokalisiert) gebildet werden. Eine Funktion der Avenacoside als präformierte Phytoalexine scheint mit dieser Lokalisierung und der Umwandlung in hämolytisch aktive 26-Desglucoavenacoside vereinbar. Mit dem heutigen Kenntnisstand, daß Saponine keine spezifischen Bestandteile der Etioplasten sind, erscheint die cytoplasmatische Herkunft der Enzyme ihrer Synthese nahezu selbstverständlich.

Die Strukturlipide MGDG, DGDG und SQDG sowie die Prenylchinone Plastochinon-9, α-Tocopherol und Phyllochinon, die in Etioplasten wie Chloroplasten nachgewiesen wurden (Ryberg et al., 1983; Douce et al., 1973; Lichtenthaler, 1969), sind sowohl in etiolierten 70S ribosomenfreien Blättern als auch in 70S ribosomenfreien chlorotischen Blättern vorhanden. Ihre Bildung ist auf die Proteinsynthese an 70S Ribosomen nicht angewiesen. Die Enzyme der Glycolipid- und Prenylchinonsynthese müssen daher alle an 80S Ribosomen des Cytoplasmas translatiert und soweit die von ihnen katalysierten Reaktionen innerhalb der Plastiden oder an deren Membranen ablaufen, aus dem Cytoplasma in die

Organellen transportiert worden sein. Die verminderte Akkumulation der Prenylchinone, die Lichtenthaler (1977) in Gerstenblättern fand, die mit Chloramphenicol behandelt worden waren, ist somit nicht auf einen Einfluß der Proteinsynthese an 70S Ribosomen auf Syntheseenzyme des Prenylchinonstoffwechsels zurückzuführen, sondern auf unspezifische Wirkungen auf die Membranbildung, z.B. auf die Synthese der Polypeptide von Chlorophyll-Protein-Komplexen. Für die Glycolipide wiesen Dorne et al. (1982) durch Untersuchungen an 70S ribosomenfreien Gerstenmutanten ebenfalls eine cytoplasmatische Translation der Enzyme nach, die ihre Synthese katalysieren.

Die Galactolipide besitzen vorwiegend Fettsäuren, die dreifach ungesättigt sind (Heinz, 1977; Douce und Joyard, 1980). Der Roggen gehört zu der Pflanzengruppe, die keine Hexadecatriensäure enthält; seine Galactolipide sind vorwiegend mit Linolensäure substituiert. Linolensäure war auch in den chlorotischen Blättern in MGDG und DGDG die vorherrschende Fettsäure. Sowohl die qualitative Fettsäurezusammensetzung als auch die Desaturierungsmuster der beiden Galactolipide der Kontrollen permissiver Wachstumsbedingungen waren nicht verändert. Die beteiligten Fettsäuredesaturasen werden somit alle an 80S Ribosomen translatiert. Dorne et al. (1982) berichten von ähnlichen Ergebnissen an 70S ribosomenfreien Gerstenmutanten; die Zusammensetzung der Fettsäuren des DGDG war in diesen Mutanten gegenüber dem Wildtyp zu den gesättigten Fettsäuren hin verschoben und trans-Δ3-Hexadecensäure, die charakteristische Fettsäure plastidären Phosphatidylglycerins, ist nur in äußerst geringen Mengen nachweisbar. Der cytoplasmatische Ursprung der Enzyme der Galactolipidsynthese wird weiterhin durch die Befunde von Blee und Schantz (1980) an Euglenamutanten und Euglena, die mit Chloramphenicol behandelt wurden, gestützt.

Die Akkumulation der Glycolipide und der Prenylchinone erreichte mit Ausnahme des Phyllochinons in den 70S ribosomenfreien Blatteilen etwa 20 bis 30 % der Gehalte, die in den entsprechenden Blatteilen grüner Blätter, die bei 22°C gewachsen waren, akkumuliert wurden. Ähnliche Unterschiede zwischen normalen grünen Blättern und 70S ribosomenfreien Blättern fanden Rademacher und Feierabend (1976) bei der Untersuchung der Carotinoide. Die Menge der Galactolipide, die in den Gerstenmutanten gebildet wurden (Dorne et al., 1982), waren deutlich niedriger als in den Roggenblättern, die bei der erhöhten Temperatur gewachsen waren. Auch für andere Chloroplastenbestandteile, für deren Bildung 80S Translationsprodukte verantwortlich sind (z.B. Phosphoribulokinase und NADP-abhängige Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase), wurden in den 70S ribosomenfreien Mutanten geringere Mengen nachgewiesen als in den chlorotischen 70S ribosomenfreien Blättern, die bei 32°C gewachsen waren (Hagemann und Börner, 1978; Feierabend, 1982). Die Mengen der Glycolipide und der Prenylchinone waren in etiolierten 70S ribosomenfreien Blättern ähnlich hoch wie in etiolierten Blättern, die bei der permissiven Temperatur (22°C) gewachsen waren. Licht induzierte bei der permissiven Wachstumstemperatur einen vielfachen Anstieg der Lipidgehalte, bei 32°C wurde dagegen eine höchstens zweifache Steigerung der Lipidakkumulation bei Wachstum im Licht beobachtet. Die Steigerung der Lipidakkumulation chlorotischer 70S ribosomenfreier Blattsegmente im Licht gegenüber der in Blattsegmenten, die bei 32°C im Dunkeln gewachsen waren, lagen in einer ähnlichen Größenordnung, wie sie für den Einfluß des Phytochromsystems im Dunkeln nach kurzzeitiger Bestrahlung mit hellrotem Licht oder nach Dauerdunkelrot-Bestrahlung von verschiedenen Autoren für Glycolipide (Unser und Mohr, 1970; Tevini, 1977) und Prenylchinone (Lichtenthaler und Kleudgen, 1975; Lichtenthaler, 1977)

berichtet wurden. In beiden Fällen werden die Synthesesysteme für Galactolipide und Prenylchinone offenbar in die Bereitschaft gesetzt, Thylakoidmembranen auszubilden. Eine weitere Akkumulation findet jedoch nicht statt, obwohl die Glycolipide und insbesondere die Prenylchinone in den Plastoglobuli gespeichert werden können (Lichtenthaler und Weinert, 1970). Die Akkumulation der Glycolipide und Prenylchinone über ein Niveau wie es in etioliérten Blättern vorkommt, scheint von der Verfügbarkeit von Chlorophyll abzuhängen und mit dessen Synthese regulatorisch verknüpft zu sein.
Daß das Ausmaß der Lipidbildung mit der Membranbildung und der Differenzierung einhergeht, zeigt sich im Vergleich der Spitzen von Blättern permissiver und nicht-permissiver Wachstumsbedingungen. Da die Spitzen der Blätter nicht-permissiver Wachstumsbedingungen 70S Ribosomen in geringen Mengen enthalten, sind sie zur Thylakoidbildung - und im Licht auch zum Ergrünen - befähigt. Die Lipidgehalte in den Spitzen der Blätter, die unter nicht-permissiven Bedingungen gewachsen waren, sind deutlich höher als in den basalen 70S ribosomenfreien Segmenten. Dies ist nicht allein auf den Altersgradienten der Blätter zurückzuführen, der durch das Wachstum mit basalem Meristem zustande kommt und -für die Glycolipide- von Leech und Mitarbeitern (Leech et al., 1971 und 1973) und von Bolton und Harwood (1978) untersucht worden ist. Während bei permissiven Bedingungen die Spitzen der Blätter etwa 50% der Glycolipide und Prenylchinone enthalten, ist dieser Anteil in den Spitzen nicht-permissiver Wachstumsbedingungen mit bis zu 70 % deutlich erhöht. Die relativ hohen Konzentrationen der Glycolipide in den grünen Spitzen der Blätter, die bei 32°C gewachsen waren, scheint auf die Ausbildung von Thylakoiden und damit auf eine Membranvermehrung gegenüber etiolierten Blättern zurückzuführen zu sein. Es wird jedoch nicht so viel Membranmaterial gebildet wie in den oberen Dritteln der grünen Kontrollblätter.

In den 70S ribosomenfreien Plastiden wird im Dunkeln die Bildung der Prothylakoide ebenso unterbunden, wie im Licht die Ausbildung der Thylakoide unterbleibt. Das führt in beiden Fällen zu einem erhöhten Anteil der Plastidenhüllmembran an den Membranen der Plastiden. Da die Hüllmembranen ein niedrigeres Verhältnis von MGDG zu DGDG aufweisen (Douce und Joyard, 1979) schlägt sich dieses in einem niedrigeren Verhältnis der beiden Galactolipide in den basalen Teilen der 70S ribosomenfreien Blätter nieder. Ein niedriges Verhältnis der beiden Galactolipide wurde auch von Dorne et al. (1982) in den Blättern von 70S ribosomenfreien Gerstenmutanten bestimmt.

Auffällig ist in diesem Zusammenhang das niedrige Verhältnis von MGDG zu DGDG in dem oberen Drittel der chlorotischen 70S ribosomenfreien Primärblätter, das nur eine ähnliche Größenordnung erreicht wie in etiolierten Blättern. Eine Korrelation des Galactolipidverhältnisses mit der Bildung der außergewöhnlichen Granastapel, die in den Plastiden der ergrünten Spitzen der chlorotischen Blätter enthalten sind, - es finden sich hier abnorme Granastapel, die die ganze Plastide durchziehen oder sphäroidal angeordnet sind (Schäfers und Feierabend, 1976) -, könnten eine mögliche Erklärung sein. Weitergehende Untersuchungen insbesondere hinsichtlich der Phospholipidzusammensetzung und der Chlorophyll-Protein-Komplexe in diesen Membranen sind jedoch nötig, bevor Aussagen hierüber zu treffen sind. Auf welche Weise die Membranlipide der Chloroplasten mit den Chlorophyll-Protein-Komplexen und anderen Membranproteinen in engem Zusammenhang stehen, zeigt sich z.B. an folgenden Untersuchungsergebnissen: Für den Light-Harvesting Chlorophyll a/b Komplex und für das mit diesem Komplex assoziierte Phosphatidylglycerin, das trans-Δ3-Hexadecensäure enthält, konnte eine Beteiligung am 'Grana Stacking' nachgewiesen werden (Staehelin und Arntzen, 1983; Guillot-Salomon et

al., 1977; Trémolière et al., 1979). Heinz und Siefermann-Harms (1981) und Wintermans (1971) fanden im Light-Harvesting Chlorphyll a/b Komplex außer Phosphatidylglycerin Galactolipide assoziiert; Galactolipide fanden diese Autoren ebenfalls in isolierten Chlorphyll-Protein-Komplexen des Photosystems I. Rawyler et al. (1980) wiesen Galactolipide und Phosphatidylglycerin im Light-Harvesting Chlorophyll a/b nach, Photosystem I enthielt dagegen SQDG und Phosphatidylglycerin. Durch Austauschexperimente mit verschieden markierten MGDG wiesen Heinz und Siefermann-Harms (1981) nach, daß die Bindung der Galactolipide zu den Komplexen nur sehr locker ist; SQDG und Phosphatidylglycerin des Photosystems I scheinen dagegen im Inneren der Chlorophyll-Protein-Komplexe eingebettet zu sein, da ihre Fettsäuren für Phospholipase A_2 nicht angreifbar waren (Rawyler et al., 1980). Inwieweit die Galactolipide für die Funktion der Chlorphyll-Protein-Komplexe oder anderer Proteine der Plastidenmembranen wichtig sind, ist eine noch offene Frage. So wurde die Aktivität von Photosystem I aus hexanextrahierten Chloroplasten durch die Zugabe von Galactolipiden weitgehend wiederhergestellt (Krupa und Baszynski, 1975). Anderson et al. (1974) konnten dagegen durch die Behandlung photosynthetischer Membranen zeigen, daß der Verlust großer Galactolipidmengen ohne Effekt auf den photosynthetischen Elektronentransport blieb, wenn die freien Fettsäuren durch Rinderserumalbumin gebunden wurden. Heinz und Siefermann-Harms (1981) geben die Menge des freien, nicht mit Chlorophyll-Protein-Komplexen assoziierten MGDG mit mehr als 80% seiner Gesamtmenge in den Thylakoiden an. Beobachtungen über die Assoziation der Glycolipide und Phospholipide mit Enzymen der Plastidenhüllmembran liegen nicht vor. Neben den Beziehungen der Glycerolipide wurden auch Carotinoide und Prenylchinone auf ihre Zugehörigkeit zu Chlorophyll-Protein-

Komplexen untersucht. Mehrere Arbeitsgruppen zeigten unabhängig voneinander, daß die verschiedenen Komplexe eine spezifische Carotinoidzusammensetzung aufweisen (Rawyler et al., 1980; Siefermanns-Harms und Ninnemann, 1979; Lichtenthaler et al., 1981; Braumann et al., 1982). Für Phyllochinon (Vitamin K_1) wiesen Interschick-Niebler und Lichtenthaler (1981) eine Beteiligung an Chlorophyll-Protein-Komplex I (CP I) nach. Plastochinon-9 ist im Cytochrom b_6/f Komplex assoziiert (Oettmeier et al., 1982).

Direkte stöchiometrische Assoziationen der verschiedenen Lipide mit Protein-Komplexen der Membranen ließen sich bisher nicht bestimmen. Es scheint jedoch, daß der Anteil fest mit Protein-Komplexen assoziierter Lipide nur gering ist und der Anteil von Lipiden, die nicht unmittelbar Membranproteinen zugeordnet sind und damit die Matrix der Membranen bilden, bei weitem überwiegt. Offen ist hier noch die Frage nach dem Lipid oder den Lipiden, die für die Einbindung der Membranproteine in die Lipidmatrix verantwortlich sind. Von seinen physikalischen Eigenschaften her scheint MGDG für diese Funktion als 'boundary lipid' prädestiniert zu sein, da es als einziges der in den Chloroplastenmembranen vorhandenen Lipide ein sogenanntes 'non-bilayer lipid' ist, d.h. es neigt in vitro zur Bildung hexagonaler Strukturen und durchläuft charakteristische Phasenübergänge in Abhängigkeit von der Temperatur (Gounaris et al., 1983; Israelachvili et al., 1980; Israelachvili, 1978; Gounaris und Barber, 1983). Eine Kontrolle der Membranbildung kann in den Chloroplasten möglicherweise dadurch erfolgen, daß sich die Bildung der Matrixlipide nach der Menge der gebildeten Pigment-Komplexe richtet.

Durch den Einbau radioaktiven Acetats in intakte Blattgewebe und in isolierte Plastiden konnte gezeigt werden, daß die Fettsäuren innerhalb der 70S ribosomen-

freien Plastiden de novo synthetisiert werden. Durch Untersuchungen von Ohlrogge et al., (1979), Nothelfer et al. (1977) und Vick und Beevers (1978) an nicht photosynthetisch aktiven Plastiden, Proplastiden und Chloroplasten wurde nahegelegt, daß die Fettsäuresynthese aller Pflanzenzellen ausschließlich in den Plastiden erfolgt. Die hier nachgewiesene cytoplasmatische Translation der Fettsäuresynthetase war aus diesem Grunde zu erwarten; bei einer plastidären Translation des Enzymkomplexes wären die betroffenen Zellen kaum lebensfähig gewesen.

Die relative Verteilung der radioaktiven Markierung in den Glycerolipiden nach dem Einbau von ^{14}C-Acetat in Blattstücken grüner, bei permissiven Bedingungen gewachsener Primärblätter war von den Ergebnissen, die Bolton und Harwood (1978) an anderen Monokotyledonen erhalten hatten, sehr verschieden. Vergleichbare Ergebnisse erhielten dagegen Slack et al. (1977) am Mais. Roughan und Slack (1982) diskutieren diese Diskrepanz dahingehend, daß eine weitere Zerkleinerung der Gewebe, die eine bessere Aufnahme des Acetats zum Ziel hat, gleichzeitig als Wundreaktion eine a) gesteigerte Fettsäuresynthese zur Bildung von Cutin und Suberin und b) eine veränderte Glycerolipidzusammensetzung auslöst. Eine Tendenz in diese Richtung zeigte sich in den Kontrollen des Einbauversuchs von ^{14}C-Acetat in Anwesenheit des Chlorophyllhemmstoffs 4,6-Dioxoheptansäure: in diesem Versuch wurden die 2 cm langen Blattsegmente in der Mitte geteilt, was zur Folge hatte, daß sich die Einbaurate gegenüber ungeteilten Segmenten verdoppelte und sich die relativen Anteile der Markierung zugunsten von MGDG verschoben während der Anteil im Phosphatidylcholin abnahm.
Das Markierungsverhalten in grünen Blättern in vivo und in isolierten Chloroplasten entsprach für die Synthese der Galactolipide dem eukaryotischen Weg, der von

Roughan et al. (1979) vorgeschlagen und von Ohnishi und Yamada (1980) bekräftigt wurde. Chloroplasten waren nur in begrenztem Maße in der Lage, eine Synthese von MGDG und DGDG durchzuführen. Die Bildung der Glycerolipide wurde offensichtlich nur bis zur Stufe der Diglyceride durchgeführt. Analog zu den Beobachtungen, die von Heinz (1977) und von Douce und Joyard (1980) zusammengefaßt wurden, scheiterte eine weitere Metabolisierung der Diglyceride wahrscheinlich daran, daß in den isolierten Chloroplasten die Desaturierung nicht über Ölsäure hinausführte und zur Galactosylierung nur Diglyceride mit zweifach ungesättigten Fettsäuren an C_1 und C_2 verwendet werden. In intakten Blattgeweben wurden dagegen MGDG und DGDG erwartungsgemäß markiert. In den jüngsten, basalen Abschnitten belichteter Blätter war die Einbaurate von radioaktivem Acetat in die gesamten Fettsäuren der Lipide und in die einzelnen Glycerolipide unabhängig von der Wachstumstemperatur nahezu gleich hoch; in den entsprechenden etiolierten Abschnitten der Blätter permissiver Wachstumsbedingungen waren die Einbauraten dagegen vergleichsweise niedrig. In den Plastiden der jüngsten Blattsegmente permissiver wie nicht-permissiver Wachstumsbedingungen scheint die Fettsäuresynthese und die Glycerolipidsynthese durch Licht stimuliert zu werden. Während der weiteren Differenzierung, also in den weiter distal gelegenen Segmenten, stieg die Einbaurate des Acetats in Fettsäuren und Glycerolipiden in den grünen Kontrollen massiv an, während die Einbauraten in den 70S ribosomenfreien Blättern sich auf ein konstant bleibendes Niveau im zweiten und dritten Segment verringerten. In den etiolierten Blättern stieg die Einbaurate in den älteren Segmenten auf ein ähnlich hohes Niveau an wie in den 70S ribosomenfreien Blättern. Die Chase-Versuche mit dem zweiten Blattsegment zeigen, daß die verminderten Einbauraten in den 70S ribosomenfreien Blättern nicht auf einen erhöhten Turnover der Lipide zurückzu-

führen sind. Bis auf das SQDG zeigten alle Glycerolipide in den 70S ribosomenfreien Blättern einen langsameren Turnover als in den grünen oder etiolierten Kontrollen. Die gegenüber grünen Blättern stark verminderten Mengen der Galactolipide, die in den chlorotischen 70S ribosomenfreien Blättern akkumulierten, werden also durch Regulation der Synthese der Galactolipide, nicht durch einen erhöhten Turnover, erreicht. Diese Regulation scheint eng mit der Verfügbarkeit von Chlorophyll und der damit verbundenen Entwicklung von Thylakoidmembranen gekoppelt zu sein. Die chlorophyllfreien etiolierten und die chlorotischen Blätter benötigen offensichtlich geringere Syntheseraten der Glycolipide, da die inneren Membransysteme ihrer Plastiden im Vergleich mit denen ausdifferenzierter Chloroplasten relativ klein sind und mehr oder weniger nur eine intakte Hüllmembran unterhalten werden muß. Die Entwicklung der Membransynthese in Etioplasten scheint relativ langsam zu erfolgen, während in den chlorotischen Blättern die Differenzierung auf einem frühen Stadium stehen bleibt und die Synthese der Membranlipide rasch reduziert wird. Hingegen zeigt der rapide Anstieg der Acetat-Inkorporation entlang der grünen Primärblätter, daß die Lipidbiosynthese mit der Chlorophyllsynthese und der Membranentwicklung einhergeht. Der Ausfall sowohl der Bildung etlicher Polypeptide der Chlorophyll-Protein-Komplexe als auch der Chlorophyllsynthese in den 70S ribosomenfreien Plastiden scheint die Bildung von Thylakoidmembranen zu verhindern und die Synthese der Lipide zu vermindern. Diese enge Kopplung und Regulation in den Plastiden ist nicht nur eine langfristige Folge des Fehlens von Chlorophyll. Auch auf kurzfristige Veränderungen der Chlorophyllsynthese z.B. durch Hemmung der δ-Aminolävulinsäure Dehydratase in den Plastiden reagieren diese mit einer unmittelbaren einschneidenden Verminderung der Galactolipidsynthese und der Fettsäuresynthese,

obwohl in den verwendeten Blattsegmenten bereits Thylakoide vorhanden sind und alle Enzyme, die zur Synthese der Galactolipide und der Fettsäuren benötigt werden, vorliegen.

Damit stellt sich die Frage, an welcher Stelle des Syntheseweges der Galactolipide eine Kontrolle erfolgt, wenn die Synthese von Chlorophyll, sei es kurzfristig durch Hemmstoffe oder langfristig durch das Fehlen der 70S Ribosomen, und damit die Bildung von Chlorophyll-Protein-Komplexen unterbunden ist. Während in allen in vivo Versuchen der Einbau radioaktiven Acetats immer gleichzeitig in Fettsäuren und Galactolipide vermindert war, war in isolierten Chloroplasten und in isolierten 70S ribosomenfreien Plastiden die Kapazität der Fettsäuresynthese nahezu gleich hoch. Der letzte Schritt der Galactolipidbildung, die Galactosylierung der Diglyceride, ist dagegen in den chlorotischen 70S ribosomenfreien Plastiden stark vermindert. Auf welche Weise es zu dieser verminderten Galactosylierung kommt, ist noch unklar. Eine Verminderung des Diglyceridpools ist neben einer Verminderung der Aktivität oder der Menge der Galactosyltransferasen einer der möglichen Wege zu einer geringeren Galactolipidbildung. Hierzu liegen einige experimentelle Daten vor. Aus den Einbauversuchen von Acetat in Chloroplasten und 70S ribosomenfreie Plastiden wird deutlich, daß die Fettsäuren auf ihrem weiteren Syntheseweg in vitro in den jeweiligen Plastiden in verschiedene bevorzugte Endprodukte gelangen. In den Chloroplasten werden Diglyceride bevorzugt gebildet, in den 70S ribosomenfreien Plastiden scheint die Diglyceridbildung dagegen nur gering zu sein und die Phosphatidsäure, die in den Hüllmembranen gebildet wurde, sogleich in Phosphatidylglycerin weiterverarbeitet zu werden. Eine geringe Aktivität oder Menge der Phosphatidsäure Phosphatase in den 70S ribosomenfreien Plastiden könnte hierfür

ebenso verantwortlich sein wie eine stark gesteigerte Aktivität der Phosphatidylglycerinsynthese, die hier insbesondere bei hohen Hydrogenkarbonat Konzentrationen beobachtet wurde. In aufgebrochenen Chloroplasten ließ sich bei einer hohen $KHCO_3$-Konzentration ebenfalls eine gesteigerte Phosphatidylglycerinsynthese erreichen, die allerdings nicht so hoch wie in chlorotischen Plastiden war.

Durch die Untersuchung an isolierten Plastiden aus 70S ribosomenfreien und grünen Blättern wird deutlich, daß der limitierende Schritt der Galactolipidsynthese in den chlorotischen 70S ribosomenfreien Blättern die Galactosylierung der Diglyceride ist, während die Fettsäuresynthese in isolierten Plastiden grüner wie chlorotischer Blätter nahezu gleich hohe Aktivitäten aufweist. Die Drosselung der Fettsäurebildung in den 70S ribosomenfreien Blättern, die in den in vivo Versuchen nachgewiesen worden war, scheint also eine sekundäre Folge der verminderten Galactosyltransferase-aktivität zu sein. Analoge Schlüsse hinsichtlich der Verminderung der Galactolipid- und Fettsäuresynthese in den Einbauversuchen in Anwesenheit des Hemmstoffs der Chlorophyllsynthese scheinen möglich, bedürfen aber noch der experimentellen Bestätigung.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Durch Anzucht von Roggen- und Haferpflanzen bei einer erhöhten Temperatur von 32°C wurden 70S ribosomenfreie Blätter erzeugt. Im Licht sind die 70S ribosomenfreien Blattabschnitte (basale 2/3) chlorotisch. In diesen Blättern wurde die Bildung von Protochlorophyll(id), Saponinen, Prenylchinonen und Glycolipiden untersucht.
Im Dunkeln gewachsene 70S ribosomenfreie Blätter bildeten Protochlorophyll(id). Seine Menge betrug etwa 40 % der Menge, die in etiolierten Primärblättern permissiver Wachstumsbedingungen nachweisbar waren. Die Chlorophyllsynthese kann in den 70S ribosomenfreien Blättern bis zum Protochlorophyll(id) durchgeführt werden, die hierzu benötigten Enzyme sind also vorhanden.
Die Akkumulation der Saponine war von den Anzuchttemperaturen und damit von 70S Translationsprodukten unabhängig; in belichteten Blättern wurde bei permissiver wie nicht-permissiver Anzuchttemperatur nahezu doppelt so viel Saponin gebildet wie in unbelichteten. Die Saponinbildung war also nicht mit dem etiolierten Zustand und dem Vorkommen von Prolamellarkörpern korreliert.
Die Enzyme zur Synthese plastidärer Prenylchinone sind von plastidären Translationsprodukten unabhängig. Bei nicht-permissiven Bedingungen gewachsene Blätter enthielten im Licht wie im Dunkeln etwa ebensoviel Plastochinon-9 und α-Tocopherol wie etiolierte Blätter permissiver Wachstumsbedingungen. Phyllochinon akkumulierte in chlorotischen Blättern nur in geringem Maße. Bei Wachstum im Dunkeln war die Menge des Phyllochinons in den Blättern von Kontrollpflanzen und in 70S ribosomenfreien Blättern gleich hoch.
In den Blättern, in denen die Chlorophyllbildung entweder durch Wachstum im Dunkeln oder aufgrund der erhöhten Anzuchttemperatur unterbunden war, wurde nur

etwa 1/3 der Prenylchinonmengen gebildet, die in grünen Kontrollen vorhanden war.
Die plastidären Glycerolipide wurden in den 70S ribosomenfreien Blättern im Licht und im Dunkeln gebildet. Die Konzentration dieser Lipide erreichte in etiolierten, etiolierten 70S ribosomenfreien und chlorotischen 70S ribosomenfreien Blättern nur etwa 1/3 der Menge, die in grünen Kontrollblättern enthalten war. Das Verhältnis von Monogalactosyl- zu Digalactosyldiacylglycerid war in den etiolierten und in den 70S ribosomenfreien Blättern sehr niedrig und ähnelte dem von Plastidenhüllmembranen. Die wichtigste Fettsäure der Galactolipide in den 70S ribosomenfreien Blättern war, wie in grünen bei permissiven Bedingungen gewachsenen Blättern, Linolensäure. Die Desaturierungsmuster der Galactolipide waren in den Blättern bei den verschiedenen untersuchten Wachstumsbedingungen qualitativ nicht verändert.

Die Rate der Fettsäure- und Glycerolipidsynthese zeigte in den Primärblättern, die bei 22°C im Licht oder im Dunkeln oder bei 32°C im Licht gewachsen waren, jeweils eine charkteristische Abhängigkeit vom Altersgradienten entlang der Blattachse dieser interkalar wachsenden Blätter. Von der Basis zur Mitte der Blätter nahm die Einbaurate radioaktiven Acetats im Licht bei permissiven Bedingungen massiv zu. In den etiolierten Blättern, die bei 22°C gewachsen waren, war die Einbaurate in den jüngsten Blattabschnitten sehr gering und erreichte in den beiden älteren Abschnitten ein gleichbleibendes Niveau, das etwa 50% der Einbaurate aufwies, die in den jüngsten belichteten Segmenten von Blättern permissiver Wachstumsbedingungen bestimmt wurden. In den chlorotischen Blättern erreichten die Einbauraten des zweiten und dritten Segments ebenfalls ein Niveau, das etwa dem der etiolierten Blätter entsprach, doch war die Einbaurate im jüngsten Segment

deutlich höher als in etiolierten Blättern. Sie erreichte etwa 70 % der Einbaurate, die in den jüngsten Teilen grüner Blätter permissiver Wachstumsbedingungen gemessen wurden.

Der Hemmstoff der Chlorophyllsynthese 4,6-Dioxoheptansäure führte in grünen Blättern zu einer raschen Hemmung der Fettsäure- und Glycerolipidsynthese. Der Turnover der einzelnen Glycerolipide unterschied sich in den etiolierten, chlorotischen oder grünen Primärblättern nur wenig, so daß eine Regulation der Lipidmengen und des Einbaus von ^{14}C-Acetat, der bei den verschiedenen Differenzierungszuständen der Plastiden in den Blättern gefunden wurde, nur durch eine Regulation der Synthese hervorgerufen worden sein kann.
In isolierten Chloroplasten und 70S ribosomenfreien Plastiden wurde ^{14}C-Acetat in nahezu gleichem Maße in die Fettsäuren eingebaut. Von den Glycerolipiden wurden in Chloroplasten die Diglyceride weitaus am stärksten markiert, in den 70S ribosomenfreien Plastiden hingegen Phosphatidylglycerin. In den chlorotischen Plastiden war die Markierung in den Diglyceriden nur gering. Die Galactolipide wurden bei diesen Einbauversuchen in Chloroplasten und chlorotischen Plastiden nur wenig markiert. Die Synthese von Phosphatidylglycerin wurde in den chlorotischen 70S ribosomenfreien Plastiden durch eine erhöhte $KHCO_3$-Konzentration stark gefördert; in Chloroplasten war eine mäßige Förderung der Phosphatidylglycerinbildung nur in osmotisch aufgebrochenen Organellen nachweisbar, gleichzeitig war die Synthese der Diglyceride aber weit stärker gefördert. Der Einbau von UDP-^{14}C-Galactose in die Galactolipide war in Chloroplasten 10 Mal stärker als in 70S ribosomenfreien Plastiden. Eine Regulation der Galactolipidakkumulation scheint daher auf eine Verminderung der Galactosylierung von Diglyceriden zurückzuführen zu sein.

VI. LITERATURNACHWEIS

Allen, C.F., und Good, P., (1971): Acyllipids in photosynthetic systems. In: San Pietro, A. (ed.): Methods in enzymology, Vol 23, 523-547, Academic Press, New York

Anderson, J.M., und Boardman, N.K., (1964): Studies on the greening of dark-grown bean plants. Aust. J. Biol. Sci. 17, 93-101

Anderson, M.M., McCarty, R.E., und Zimmer, E.A., (1974): The role of galactolipids in spinach chloroplast lamellar membranes. I. Partial purification of a bean leaf galactolipid lipase and its action on subchloroplast particles. Plant Physiol. 53, 699-704

Arnon, D.I., (1949): Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol. 24, 1-15

Bahl, J, Francke, B., und Monéger, R., (1976): Lipid composition of envelopes, prolamellar bodies and other plastid membranes in etiolated, green and greening wheat leaves. Planta 129, 193-201

Benson, A.A., Daniel, H., und Wiser, R., (1959):A sulfolipid in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 45, 1582-1587

Benson, A.A., Wiser, R., Ferrari, R.A., und Miller, J.A., (1958): Photosynthesis of galactolipids. J. am. Chem. Soc. 80, 4740

Bertrams, M., und Heinz, E., (1981): Positional specifity and fatty acid selectivity of purified sn-glycerol 3-phosphate acyltransferase from chloroplasts. Plant Physiol. 68, 653-657

Bickel, H., Palme, L., und Schultz, G., (1978): Incorporation of shikimate and other precursors into aromatic amino acids and prenylquinones of isolated spinach chloroplasts. Phytochemistry 17, 119-124

Blee, E., und Schantz, R., (1980): Galactolipid biosynthesis in Euglena gracilis. In: Mazliak, P., Beneviste, P., Costes, C., und Douce, R., (eds.): Biogenesis and function of plant lipids, 127-130, Elsevier, Amsterdam

Bligny, R., und Douce, R., (1980): A precise localisation of cardiolipin in plant cells. Biochim. Biophys. Acta 617, 254-263

Block, M.A., Joyard, J., und Douce, R., (1980): Site of synthesis of geranylgeraniol derivatives in intact spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 631, 210-219

Bolton, P., und Harwood, J.L., (1978): Lipid metabolism in green leaves of developing monocotyledons. Planta 139, 267-272

Braumann, Th., Weber, G., und Grimme, L.H., (1982): Carotenoid and chlorophyll composition of light-harvesting and reaction centre proteins of the thylakoid membrane. Photochem. Photobiophys. 4, 1-8

Bünger, W., und Feierabend, J., (1980): Capacity for RNA-synthesis in 70S ribosome-deficient plastids of heat-bleached rye leaves. Planta 149, 163-169

Carter, H.E., McCluer, R.H., und Slifer, E.D., (1956): Lipids of wheat flour. I. Characterization of galactosylglycerol components. J. am. Chem. Soc. 78, 3735-3738

Chapman, D.J.., De-Felice, J., und Barber, J., (1983): Growth temperature effects on thylakoid membrane lipid and protein content of pea chloroplasts. Plant Physiol. 72, 225-228

Cronan, J.E., und Gelmann, E.P., (1975): Physical properties of membrane lipids: Biological relevance and regulation. Bacteriol. Rev. 39, 232-256

Donaldson, R.P., Tolbert, N.E., und Schnarrenberger, C., (1972): A comparison of microbody membranes with microsomes and mitochondria from plant and animal tissue. Arch. Biochem. Biophys. 152, 199-215

Dorne, A.-J., Carde, J.-P., Joyard, J., Börner, Th., und Douce, R., (1982): Polar lipid composition of a plastid ribosome-deficient barley mutant. Plant Physiol. 69, 1467-1470

Douce, R., Holtz, R.B., und Benson, A.A., (1973): Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts. J. Biol. Chem. 248, 7215-7222

Douce, R., und Joyard, J., (1979): Structure and function of the plastid envelope. Adv. Bot. Res. 7, 1-116

Douce, R., und Joyard, J., (1980): Plant galactolipids. In: Stumpf, P.K., und Conn, E.E., (eds.): The biochemistry of plants, Vol 4, Lipids: Structure and function, 321-362, Academic Press, New York

Drapier, D., Dubacq, J.-P., Trémolières, A., und Mazliak, P., (1982): Cooperative pathway for lipid biosynthesis in young pea leaves: Oleate exportation from chloroplasts and subsequent integration into complex lipids of added microsomes. Plant Cell Physiol. 23, 125-135

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., und Smith, F., (1956): Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28, 350

Dubacq, J.-P., Drapier, D., und Trémolières, A., (1983): Polyunsaturated fatty acid synthesis by a mixture of chloroplast and microsomes from spinach leaves: Evidence for two distinct pathways of the biosynthesis of trienoic acids. Plant Cell Physiol. 24, 1-9

Elias, B.A., und Givan, C.V., (1979): Localisation of pyruvate dehydrogenase complex in Pisum sativum chloroplasts. Plant Sci. Lett. 17, 115-122

Ellis, R.J., (1981): Chloroplast proteins: synthesis, transport and assembly. Ann. Rev. Plant Physiol. 32, 111-137

Emmerie, A., und Engel, C., (1943): The tocopherol (vitamin E) content of foods and its chemical determination. Z. Vitaminforsch. 13, 259-266

Feierabend, J., (1969): Der Einfluß von Cytokininen auf die Bildung von Photosyntheseenzymen in Roggenkeimlingen. Planta 84, 11-29

Feierabend, J., (1977): Capacitiy for chlorophyll synthesis in heat-bleached 70S ribosome-deficient rye leaves. Planta 135, 83-88

Feierabend, J., (1982): Inhibiton of chloroplast ribosme formation by heat in higher plants. In: Edelman, M., Hallick, R.B., und Chua, N.-H., (eds.): Methods in chloroplast molecular biology, 671-680, Elsevier, Amsterdam

Feierabend, J., Biekmann, S., Höinghaus, R., und Kosmac, U., (1984): Investigation of chloroplast membrane formation and its control with the aid of heat-bleaches 70S ribosome-deficient leaves. In: Ohad, J., und Klein. S., (eds.): Chloroplast structure and function. Israel J. Bot., Sonderband, in Druck

Feierabend, J., Berger, Chr., und Meyer, A., (1969): Spezifische Störungen von Entwicklung und Enzymbildung der Plastiden höherer Pflanzen durch hohe Wachstumstemperaturen. Z. Naturforchung, 24b, 1641-1647

Feierabend, J., und Mikus, M., (1977). Occurrence of a high temperature sensitivity of chloroplast ribosome formation in several higher plants. Plant Physiol. 59, 863-867

Feierabend, J., und Schrader-Reichhardt, U., (1976): Biochemical differentiation of plastids and other organelles in rye leaves with a high-temperature-induced deficiency of plastid ribosomes. Planta 129, 133-145

Ferrari, R.A., und Benson, A.A., (1961): The path of carbon in photosynthesis of the lipids. Arch. Biochem. Biophys. 93, 185-192

Flügge, U.-I., (1982): Biogenesis of the chloroplast phosphate translocator. FEBS Letters 140, 273-276

Folch, J., Lees, M., und Sloane Stanley, G.H., (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497-509

Frentzen, M., Heinz, E., McKeon, T., und Stumpf, P.K., (1982): De novo biosynthesis of galactolipid molecular species by reconstituted enzyme systems from chloroplasts. In: Wintermans, J.F.G.M., und Kuiper, P.J.C., (eds.): Biochemistry and metabolism of plant lipids, 141-152, Elsevier, Amsterdam

Fuchs, R., Haas, R., Wrage, K., und Heinz, E., (1981): Phospholipid composition of chlorophyll-free mitochondria isolated via protoplasts from oat mesophyll cells. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1069-1078

Gillanders, B., und Mackender, R.O. (1984): Galactosyltransferase activity in developing plastids from naturally greening oat leaves. In: Sybesma, C., (ed.): Advances in photosynthesis research, 603-606, Nijhoff/Dr. Junk Publishers, The Hague, Boston, Lancaster

Goodwin, T.W., (1977): The prenyllipids of the membranes of higher plants. In Tevini, M., und Lichtenthaler, H.K., (eds.): Lipids and lipid polymers in higher plants, 29-47, Springer, Heidelberg

Gounaris, K., und Barber, J., (1983): Monogalactosyldiacylglycerol: the most abundant polar lipid in nature. Trends Biochem. Sci. 8, 378-381

Gounaris, K., Sundby, C., Anderson, B., und Barber, J., (1983): Lateral heterogeneity of polar lipids in the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. FEBS Letters 156, 170-174

Gough, S.P., und Kannangara, C.G., (1976): Synthesis of δ-aminolevulinic acid by isolated plastids. Carlsberg Res. Commun. 41, 183-190

Guillot-Salomon, T., Tuquet, C., Hallais, M.F., und Signol, M., (1977): Effects d'un éclairement continu sur l'ulrastructure et la composition lipidique des plastes de feuilles étiolées d'Orge verdies en éclairement intermittent. Biol.Cell. 28, 168-178

Guillot-Salomon, T., Trémolières, A., Tuquet, C., und Dubacq, J.-P., (1980): Trans-3-hexadecenoic acid and grana stacking. In: Mazliak, P., Beneviste, P., Costes, C., und Douce, R., (eds.): Biogenesis and function of plant lipids, 95-98, Elsevier, Amsterdam

Hagemann, R., und Börner, Th., (1978): Plastid ribosome-deficient mutants of higher plants as a tool in studying chloroplast biogenesis. In: Akoyunoglou, G., und Argyroudi-Akoyunoglou, J.H., (eds.): Chloroplast development, 709-720, Elsevier, Amsterdam

Haverkate, F., und van Deenen, L.L.M., (1965): Isolation and chemical characterization of phosphatidyl glycerol from spinach leaves. Biochim. Biophys. Acta 106, 78-92

Hawke, J.C., Rumsby, M.G., und Leech, R.M., (1974): Lipid biosynthesis in green leaves of developing maize. Plant Physiol. 53, 555-561

Heber, U., und Heldt, H.W., (1981): The chloroplast envelope: Structure, function, and role in leaf metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 32, 139-168

Heemskerk, J.W., Bögemann, G., und Wintermans, J.F.G.M., (1983): Turnover of galactolipids incorporated into chloroplast envelopes. An assay for galactolipid: galactolipid galactosyltransferase. Biochim. Biophys. Acta 754, 181-189

Heinz, E., (1977): Enzymatic reactions in galactolipid biosynthesis. In: Tevini, M., und Lichtenthaler, H.K., (eds.): Lipid and lipid polymers in higher plants, 102-120, Springer, Heidelberg, Berlin, New York

Heinz, E., und Roughan, P.G., (1983): Similarities and differences in lipid metabolism of chloroplasts isolated from 18:3 and 16:3 plants. Plant Physiol. 72, 273-279

Heinz, E., und Siefermann-Harms, D., (1981): Are galactolipids integral components of the chlorophyll-protein complexes in spinach thylakoids? FEBS Letters 124, 105-111

Herrmann, R.G., und Feierabend, J., (1980): The presence of DNA in ribosome-deficient plastids of heat-bleached rye leaves. Eur. J. Biochem. 104, 603-609

Herrmann, R.G., und Possingham, J.V., (1980). Plastid DNA - the plastome. In: Reinert, J., (ed.): Results and problems in cell differentiation, Vol 10, Chloroplasts, 45-96, Springer, Heidelberg, Berlin, New York

Herrmann, R.G., Westhoff, P., Alt, J., Winter, P., Tittgen, J., Bisanz, C., Sears, B.B., Nelson, N., Hurt, E., Hauska, G., Viebrock, A., und Sebald, W., (1983): Identification and charakterization of genes for polypeptides of the thylakoid membrane. In: Ciferri, O., and Dure, L., (eds.): Structure and function of plant genomes, 143-153, Plenum Press, New York, London

Höinghaus, R., (1984): Dissertation, Ruhr-Universität Bochum

Höinghaus, R., und Feierabend, J., (1983): Rapid purification of intact chloroplasts and heat-bleached ribosome-deficient plastids from rye leaves on discontinuous percoll gradients. Protoplasma 118, 114-120

Interschick-Niebler, E., und Lichtenthaler, H.K., (1981): Partition of phylloquinone K_1 between digitonin particles and chlorophyll-proteins of chloroplast membranes from Nicotiana tabacum. Z. Naturforsch. 36 c, 276-283

Israelachvili, J., (1978): The packing of lipids and proteins in membranes. In: Deamer, D.W., (ed.): Light transducing membranes. Structure, function and evolution, 91-107, Academic Press, New York

Israelachvili, J.N., Marcelja, S., und Horn, R.G., (1980): Physical principles of membrane organization. Q. Rev. Biophys. 13, 121-200

Jacobson, B.S., Jaworski, J.G., und Stumpf, P.K., (1974): Fat metabolism in higher plants. LXII. Stearyl-acyl carrier protein desaturase from spinach chloroplasts. Plant Physiol. 54, 484-486

Jamieson, G.R., und Reid, E.H., (1971): The occurrence of hexadeca-7,10,13-trienoic acids in the leaf lipids of angiosperms. Phytochemistry 10, 1837-1843

Joyard, J., und Douce, R., (1976a): Préparation et activités enzymatiques de l'enveloppe des chloroplastes d'Épinard. Physiol. Veg. 14, 31-48

Joyard, J., und Douce, R., (1976b): Mise en evidence et role des diacylglycerols de l'enveloppe des chloroplastes d'Epinard. Biochim. Biophys. Acta 424, 125-131

Joyard, J., und Douce, R., (1979): Characterization of phosphatidate phosphohydrolase activity associated with chloroplast envelope membranes. FEBS Letters 102, 147-150

Kader, J.-C., Douady, D., Julienne, M., Grosbois, M., Guerbette, F., und Vergnolle, C., (1982): Phospholipid transfer proteins from maize seeds and spinach leaves. In: Wintermans, J.F.G.M., und Kuiper, P.J.C., (eds.): Biochemistry and metabolism of plant lipids, 107-110, Elsevier, Amsterdam

Kannangara, C.G., Gough, S.P., Hansen, B., Rasmussen, J.N., und Simpson, D.J., (1977): A homogenizer with replaceable razor blades for bulk isolation of active barley plastids. Carlsberg Res. Commun. 42, 431-439

Kates, M., (1960): Chromatographic and radioisotopic investigations of the lipid components of runner bean leaves. Biochim. Biophys. Acta 41, (315-328)

Kates, M., (1970): Plant phospholipids and glycolipids. Advan. Lipid Res. 8, 225-265

Kates, M., (1972): Techniques of lipidology. In: Work, T.S., und Work, E., (eds.): Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, 275-610, North-Holland Publishing Company, Amsterdam

Kesselmeier, J., (1982): Steroidal saponins in etiolated, greening and green leaves and in isolated etioplasts and chloroplasts of Avena sativa. Protoplasma 112, 127-132

Kesselmeier, J., und Budzikiewicz, H., (1979): Identification of saponins as structural building units in isolated prolamellar bodies from etioplasts of Avena sativa. Z. Pflanzenphysiol. 91, 333-344

Kesselmeier, J., und Ruppel, H.G., (1979): Relations between saponin concentration and prolamellar body structure in etioplasts of Avena sativa during greening and re-etiolating and in etioplasts of Hordeum vulgare and Pisum sativum. Z. Pflanzenphysiol. 93, 171-184

Kesselmeier, J., und Urban, B., (1983): Subcellular localization of saponins in green and etiolated leaves and green protoplasts of oat. Protoplasma 114, 133-140

Kosmac, U., (1980): Glycolipide und Phospholipide in Chloroplasten von Blättern mit chlorotischen, ribosomenfreien Platiden. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum

Kolattukudy, P.E., (1980): Biopolyesters of plants. Cutin and suberin. Science 208, 990-1000

Krebs, K.G., Heusser, D., und Wimmer, H., (1967): Sprühreagentien. In: Stahl, E., (ed.): Dünnschicht-Chromatographie, 813-861, Springer, Berlin

Krupa, Z., und Baszynski, T., (1975): Requirement of galactolipids for photosystem I activity in lyophylized spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 408, 26-34

Leech, R.M., Rumsby, M.G., und Thomson, W.W., (1973): Plastid differentiation, acyl lipid, and fatty acid changes in developing green maize leaves. Plant Physiol. 52, 240-245

Leech, R.M., Rumsby, M.G., Thomson, W.W., Crosby, W., und Wood, P., (1971): Lipid changes during plastid differentiation in developing maize leaves. In: Forti, G., Avron, M., und Melandri, A., (eds.): Proceedings 2nd Int. Congr. Photos. Res., Stresa, 2479-2488, Dr. Junk, Den Haag

Lem, N.W., und Williams, J.P., (1978): The effect of light intensity on galactolipid synthesis in Vicia faba leaves. Phytochemistry 17, 1893-1896

Lichtenthaler, H.K., (1969): Light-stimulated synthesis of plastid quinones and pigments in etiolated barley seedlings. Biochim. Biophys. Acta 184, 164-172

Lichtenthaler, H.K., (1977): Regulation of prenylquinone synthesis in higher plants. In: Tevini, M., und Lichtenthaler, H.K., (eds.): Lipids and lipid polymers in higher plants, 231-258, Springer, Berlin-Heidelberg

Lichtenthaler, H.K., (1980): Prenylquinones in plant leaves. In: Mazliak, P., Beneviste, P., Costes, C., und Douce, R., (eds.): Biogenesis and function of plant lipids, 299-310, Elsevier, Amsterdam

Lichtenthaler, H.K., Karunen, P., und Grumbach, K.H., (1977): Determination of Prenylquinones in green photosynthetically active moss and liver moss tissues. Physiol. Plant. 40, 105-110

Lichtenthaler, H.K., und Kleudgen, H.K., (1975): Phytochromsystem und Lipochinonsynthese in den Plastiden etiolierter Hordeum-Keimlinge. Z. Naturforsch. 30c, 64-66

Lichtenthaler, H.K., und Park, R.B., (1963): Chemical composition of chloroplast lamellae from spinach. Nature 198, 1070-1072

Lichtenthaler, H.K., und Pfister, K., (1978a): Praktikum der Photosynthese, 1. Auflage, Quelle und Meyer, Heidelberg

Lichtenthaler, H.K., und Pfister, K., (1978b): In: Metzner, H., (ed.): Photosynthetic oxygen evolution, 177-193, Academic Press, London

Lichtenthaler, H.K., Prenzel, U., Douce, R., und Joyard, J., (1981): Localization of prenylquinones in the envelope of spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 641, 99-105

Lichtenthaler, H.K., und Tevini, M., (1969): Die Wirkung von UV-Strahlen auf die Lipochinon-Pigment-Zusammensetzung isolierter Spinatchloroplasten. Z. Naturforsch. 24b, 764-769

Lichtenthaler, H.K., und Weinert, H., (1970): Die Beziehungen zwischen Lipochinonsynthese und Plastoglobulibildung in den Chloroplasten von Ficus elastica Roxb. Z. Naturforsch. 25b, 619-623

Liedvogel, B., und Stumpf, P.K., (1982): Origin of acetate in spinach leaf cell. Plant Physiol. 69, 897-903

Löffelhardt, W., und Kindl, H., (1979): Conversion of 4-hydroxyphenylpyruvic acid into homogentisic acid at the thylakoid membrane of Lemna gibba. FEBS Letters 104, 332-334

Lütz, C., (1978): Separation and comparison of prolamellar bodies and prothylakoids of etioplasts from Avena sativa L. In: Akoyunoglou, G., und Argyroudi-Akoyunoglou, J.H., (eds.): Chloroplast development, 481-488, Elsevier, Amsterdam

Lütz, C., (1981): Distribution of carotenoids and lipids in separated prolamellar bodies and prothylakoids of etioplasts from Avena sativa L. Z. Pflanzenphysiol. 104, 43-52

Lütz, C., und Klein, S., (1979): Biochemical and cytological observations on chloroplast development. VI. Chlorophylls and saponins in prolamellar bodies and prothylakoids from Avena sativa leaves. Z. Pflanzenphysiol. 95, 227-237

Mazliak, P., (1977): Glyco- and phospholipids of biomembranes in higher plants. In: Tevini, M., und Lichtenthaler, H.K., (eds.): Lipid and lipid polymers in higher plants, 48-74, Springer, Heidelberg, Berlin, New York

McKee, J.W.A., und Hawke, J.C., (1979): The incorporation of ^{14}C-acetate into the constituent fatty acids of monogalactosyldiglyceride by isolated spinach chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. 197, 322-332

Meller, E., und Gassman, M.L., (1981): The effects of levulinic acid and 4,6-dioxoheptanoic acid on the metabolism of etiolated and greening barley leaves. Plant Physiol. 67, 728-732

Meller, E., und Gassman, M.L., (1982): Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid: Two pathways in higher plants. Plant Sci. Letters 26, 23-29

Menke, W., und Jakob, E., (1942): Untersuchungen über das Protoplasma grüner Pflanzenzellen. IV. Die Lipoide der Spinatchloroplasten. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 272, 227-231

Miernyk, J.A., und Dennis, D.T. (1982): Isozymes of glycolytic enzymes in endosperm from developing castor oil seeds. Plant Physiol. 69, 825-828

Moczar, E., (1973): Mapping and specific detection of glycopeptides on thin-layer plates. J. Chromatogr. 76, 417-424

Mudd, J.B., und Dezacks, R., (1981): Synthesis of phosphatidylglycerol by chloroplasts from leaves of Spinacia oleracea L.. Arch. Biochem. Biophys. 209, 584-591

Mudd, J.B., und Garcia, R.E., (1975): Biosynthesis of glycolipids. In: Gaillard, T., und Mercer, E.T., (eds.): Recent advances in the chemistry and biochemistry of plant lipids, 161-201. Academic Press, London, New York

Müller, B., und Göke, G., (1973): Gaschromatographische Bestimmung von Fettsäuren in Speisefetten und -ölen. Lebensmittelchemie u. gerichtl. Chem. 27, 165-175

Nothelfer, H.G., Barckhaus, R.H., und Spener, F., (1977): Localisation and characterization of the fatty acid synthesizing system in cells of Glycine max (soybean) suspension cultures. Biochim. Biophys. Acta 489, 370-380

Oettmeier, W., Masson, K., Soll, H.J., Hurt, E., und Hauska, G., (1982): Photoaffinity labelling of plastoquinone binding sites in chloroplast cytochrome b_6/f complex. FEBS Letters 144, 313 - 317

Ohlrogge, J.B., Kuhn, D.A., und Stumpf, P.K., (1979): Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of Spinacia oleracea. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1194-1198

Ohnishi, J., und Yamada, M., (1980): Glycerolipid synthesis in Avena leaves during greening of etiolated seedlings. II.α-Linolenic acid synthesis. Plant Cell Physiol. 21, 1607-1618

Ongun, A., und Mudd, J.B., (1968): Biosynthesis of galactolipids in plants, J. Biol. Chem. 243, 1558-1566

Philipp, E.T., Franke, W.W., Keenan, T.W., Stadler, J., und Jarasch, E.-D., (1976): Characterization of nuclear membranes and endoplasmic reticulum isolated from plant tissue. J. Cell Biol. 68, 11-29

Rademacher, E., und Feierabend, J., (1976): Formation of chloroplast pigments and sterols in rye leaves deficient in plastid ribosomes. Planta 129, 147-153

Rawyler, A., Henry, L.E.A., und Siegenthaler, P.-A., (1980): Acyl and pigment lipid composition of two chlorophyll proteins. Carlsberg Res. Commun. 45, 443-451

Robinson, S.P., und Wiskich, J.T., (1977): Pyrophosphate inhibition of carbon dioxide fixation in isolated pea chloroplasts by uptake in exchange for endogenous adenine nucleotides. Plant Physiol. 59, 422-427

Roughan, P.G., (1970): Turnover of the glycerolipids of pumpkin leaves. The importance of phosphatidylcholine. Biochem. J. 117, 1-8

Roughan, P.G., (1975): Phosphatidyl Choline: Donor of 18-carbon unsaturated fatty acids for glycerolipid biosynthesis. Lipids 10, 609-614

Roughan, P.G., Holland, R., und Slack, C.R., (1979a): On the control of long-chain-fatty acid synthesis in isolated intact spinach (Spinacia oleracea) chloroplasts. Biochem. J. 184, 193-202

Roughan, P.G., Holland, R., und Slack, C.R., (1979b): The role of chloroplasts and microsomal fractions in polar-lipid synthesis from 1-^{14}C-acetate by cell-free preparations from spinach (Spinacia oleracea) leaves. Biochem. J. 188, 17-24

Roughan, P.G., und Slack, C.R., (1982): Cellular organization of glycerolipid metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 33, 97-132

Russel, N.J., und Harwood, J.L., (1979): Changes in the acyl lipid composition of photosynthetic bacteria grown under photosynthetic and non-photosynthetic conditions. Biochem. J. 181, 339-345

Ryberg, M., Sandelius, A.S., und Selstam, E., (1983): Lipid composition of prolamellar bodies and prothylakoids of wheat etioplasts. Physiol. Plant. 57, 555-560

Ryberg, M., und Sundqvist, Chr., (1982): Characterization of prolamellar bodies and prothylakoids fractionated from wheat etioplasts. Physiol. Plant. 56, 125-132

Sato, N., und Murata, N., (1982): Lipid biosynthesis in the blue-green alga, Anabaena variabilis. II. Fatty acid and lipid molecular species. Biochim. Biophys. Acta 710, 279-289

Sato, N., Murata, N., Miura, Y., und Ueta, N., (1979): Effect of growth temperature on lipid and fatty acid compositions in the blue-green algae, Anabaena variabilis and Anacystis nidulans, Biochim. Biophys. Acta 572, 19-28

Schäfers, H.-A., und Feierabend, J., (1976): Ultrastructural differentiation of plastids and other organelles in rye leaves with a high-temperature-induced deficiency of plastid ribosomes. Cytobiol. 14, 75-90

Sieberts, H.P., Heinz, E., Linscheid, M., Joyard, J., und Douce, R., (1979): Characterization of lipids from chloroplast envelopes. Eur. J. Biochem. 101, 429-438

Siefermann-Harms, D., und Ninnemann, H., (1979): The separation of photochemically active PS-I and PS-II containing chlorophyll-protein complexes by isoelectric focusing of bean thylakoids on polyacrylamide gel plates. FEBS Letters, 104, 71-77

Slack, C.R., und Roughan, P.G., (1975): The kinetics of incorporation in vivo of ^{14}C-acetate and $^{14}CO_2$ into the fatty acids of glycerolipids in developing leaves. Biochem. J. 152, 217-228

Slack, C.R., Roughan, P.G., und Blasingham, N., (1977): Labelling studies in vivo on the metabolism of the acyl and glycerol moieties of the glycerolipids in the developing maize leaf. Biochem. J. 162, 289-296

Soll., J., Douce, R., und Schultz, G., (1980a): Site of biosynthesis of alpha-tocopherol in spinach chloroplasts. FEBS Letters 112, 243-246

Soll, J., Kemmerling, M., und Schultz, G., (1980b): Tocopherol and plastoquinone synthesis in spinach chloroplast subfractions. Arch. Biochem. Biophys. 204, 544-550

Staehelin, L.A., und Arntzen, C.J. (1983): Regulation of chloroplast membrane function: Protein phosphorylation changes the spatial organization of membrane components. J. Cell. Biol. 97, 1327-1337

Stumpf, P.K., (1980): Biosynthesis of saturated and unsaturated fatty acids. In: Stumpf, P.K., und Conn, E.E. (eds.): The biochemistry of plants, Vol 4, Lipids: Structure and function, 177-204, Academic Press, New York

Tevini, M., (1977): Light, function, and lipids during plastid development. In: Tevini, M., und Lichtenthaler, H.K., (eds.): Lipids and lipid polymers in higher plants, 121-145, Springer, Heidelberg

Trebst, A., (1978): Plastoquinones in photosynthesis. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 284, 591-599

Trémolières, A., Guillot-Salomon, T., Dubacq, J.-P., Jacques, R., Mazliak, P., und Signol, M., (1979): The effect of monochromatic light on α-linolenic and trans-3-hexadecenoic acids biosynthesis, and its correlation to the development of the plastid lamellar system. Physiol. Plant 45, 429-436

Tschesche, R., und Schmidt, W., (1966): Zwei neue Saponine der oberirdischen Teile des Hafers (Avena sativa) mit Nuatigenin als Aglycon. Z. Naturforsch. 21 b, 896-897

Unser, G., und Mohr, H., (1970): Phytochrome-mediated increase of galactolipids in mustard seedlings. Naturwissenschaften 57, 358-359

Van Besouw, A., und Wintermans, J.F.G.M., (1979): The synthesis of galactosyldiacylglycerols by chloroplast envelopes. FEBS Letters 102, 33-37

Vick, B., und Beevers, H., (1978): Fatty acid synthesis in endosperm of young castor bean seedlings. Plant Physiol. 62, 173-178

Weinstein, J.D., und Castelfranco, P.A., (1977a): Protoporphyrin IX biosynthesis from glutamate in isolated greening chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. 178, 671-673

Weinstein, J.D., und Castelfranco, P.A., (1977b): Incorporation of ^{14}C-glutamate in 5-aminolevulinic acid (ALA) by isolated chloroplasts. Plant Physiol. 59, suppl. P 92

Williams, M., und Randall, D.D., (1979): Pyruvate dehydrogenase complex from chloroplasts of Pisum sativum L. Plant Physiol. 64, 1099-1103

Wintermans, J.F.G.M., (1960): Concentrations of phosphatides and glycolipids in leaves and chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 44, 49-54

Wintermans, J.F.G.M., (1962): Phosphatides and galactolipids of the photosynthetic apparatus. Coll. Intern. Photosynthese, Gif-sur-Yvette, 381-385

Wintermans, J.F.G.M., (1971): On the galactolipid composition of subchloroplast fractions. Biochim. Biophys. Acta 248, 530-535

Wintermans, J.F.G.M., Bögemann, G., und Heemskerk, J.W.M., (1984): Regulation of the galactolipid synthesis in spinach chloroplasts. In: Sybesma, C., (ed.): Advances in photosynthesis research, Vol III. 147-150, Nijhoff/Dr. Junk Publishers, The Hague, Boston, Lancaster

Zepke, H.D., Heinz, E., Radunz, A., Linscheid, M., Pesch, R., (1978): Combination and positional distribution of fatty acids in lipids from blue-green algae. Arch. Microbiol. 119, 157-162

Herrn Prof. Dr. J. Feierabend, der mir das Thema der vorliegenden Arbeit überließ, danke ich herzlich für die stete Anteilnahme am Fortgang der Arbeit, die Unterstützung durch Diskussionen und die dadurch vermittelten Anregungen.
Die Arbeit wurde durch Sachbeihilfen der Deutschen Forschungsgemeinschaft an Herrn Prof. Dr. J. Feierabend unterstützt.

Herrn Prof. Dr. H.K. Lichtenthaler, Universität Karlsruhe, danke ich für die Einführung in die Methodik der Prenylchinonanalysen.

Herrn Dr. J. Kesselmeier, Universität Köln, danke ich für seine Bereitschaft zur Diskussion der Ergebnisse der Saponinanalysen.

L E B E N S L A U F

Am 9. April 1954 wurde ich, Udo Kosmac, als ältester Sohn des Elektromonteurs Günter Kosmac und seiner Ehefrau Olga, geb. Thissen, in Moers geboren.

In den Jahren 1960 bis 1965 besuchte ich die Volksschule, von 1965 bis 1968 die Realschule und ab 1968 das Aufbaugymnasium in Moers, das ich im Mai 1973 mit dem Abitur abschloß.

Meine Bundeswehrdienstzeit leistete ich von Juli 1973 bis Juni 1975 ab.

Im Wintersemester 1975 nahm ich das Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum auf. Dieses schloß ich im Juli 1980 mit der Diplomhauptprüfung ab.

Im September 1980 nahm ich die Arbeit an der vorliegenden Dissertation unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. J. Feierabend auf.

Von September 1980 war ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter zunächst in Bochum an der Ruhr-Universität, seit Januar 1981 an der J.W. Goethe-Universität Frankfurt in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Feierabend tätig.

D. GRÄBNER
Dissertations- u. Offsetdruckerei
Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon 09545 / 8791